

**Caracterización la región V3 de la glicoproteína de envoltura
(gp120) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en una
muestra de individuos infectados de la región Caribe
Colombiana.**

JOSE LUIS VILLARREAL CAMACHO
MICROBIOLOGO

Director de trabajo de Grado:
Guillermo Cervantes Acosta, Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL NORTE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



BARRANQUILLA, COLOMBIA,

2011

**Caracterización la región V3 de la glicoproteína de envoltura
(gp120) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en una
muestra de individuos infectados de la región Caribe
Colombiana.**

Trabajo de grado, presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas.

Director de trabajo de Grado:
Guillermo Cervantes Acosta, Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL NORTE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



BARRANQUILLA, COLOMBIA,

2011

NOTA DE ACEPTACION

Aprobado por el comité evaluador de trabajos de grado de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad del Norte, en el cumplimiento de los requisitos exigidos para otorgar el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas.

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Barranquilla, _____ de 2011.

- Gabriel, gracias por enseñarme a ser papa, Ana... mi corazón!
- ¿Por qué guardas silencio?...cierra la ventana, no ves que estoy desnudo y la luz me quema.

jvillarreal

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento:

A **Guillermo Cervantes Acosta, Ph D.** Director del Trabajo de Grado, director del grupo de investigaciones en Virología. Universidad del Norte, Barranquilla, por sus enseñanzas, guía y permanente consejo.

A **Lucy Palacio, MD.** Infectóloga Hospital General de Barranquilla, por su invaluable ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

A **Carlos Silvera, Ph D.** Docente de Genética Clínica, Programa de Medicina de la Universidad del Norte, por su constante colaboración y ánimo en seguir adelante.

A **Homero San Juan, Ph. D.** Docente investigador, director del grupo de investigaciones en Virología, por sus comentarios y agudas recomendaciones.

A **Alma Polo Barrios,** Docente de Biología Molecular, Universidad del Norte, por sus consejos, apoyo y ejemplo de vida.

A **Ricardo Jiménez,** Auxiliar de Laboratorio de Biología, por su colaboración en el desarrollo de los experimentos.

A **Rubén Jaramillo, Ph. D.** Docente Universidad Libre, líder Grupo de Investigaciones en Biomembranas (GIBIOM), por su constante consejo, ejemplo y mostrarme el camino que debía seguir.

A **Daniel Villanueva, Ph. D. Director de Grupo De Investigación en Bioquímica Patológica (GRUBIOPAT),** Docente Universidad Libre Seccional Barranquilla, por su constante consejo y apoyo incondicional.

A **Isis Arias,** Bióloga. Por su ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

Al Hospital General de Barranquilla y a la Institución Prestadora de Salud Centro de Medicina Integral

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron con la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su especial agradecimiento a:

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS.

El cual financió mediante convenio No 418-2004 UNINORTE-COLCIENCIAS este trabajo.

Únicamente los autores son los responsables de las ideas expuestas en este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEORICO	20
1.1 Clasificación taxonómica.	20
1.2 Subpoblaciones heterogéneas y formas recombinantes circulantes (FRC)	22
1.3 Las proteínas del VIH.	25
1.3.1 Proteínas de estructura.	25
1.3.2 La proteína de la matriz (MA).	26
1.3.3 La proteína de la cápside (CA).	27
1.3.4 La proteína de la nucleocápside (NC).	28
1.3.5 La proteína p6.	29
1.4 Las enzimas virales.	30
1.4.1 Integrasa.	30
1.4.2 Transcriptasa reversa.	31
1.4.3 Proteasa.	34
1.5 Las proteínas auxiliares.	35
1.5.1 Las proteínas reguladoras.	35
1.5.1.1 Tat (Transactivador transcripcional).	35
1.5.1.2 Rev (Regulador de la expresión viral).	36
1.5.2 Las proteínas accesorias.	37
1.5.2.1 Proteína Nef.	37
1.5.2.2 Proteína Vpu.	37
1.5.2.3 Proteína Vpr.	38
1.5.2.4 Proteína Vif.	39
1.6 Las glicoproteínas de la envoltura.	39
1.6.1 Glicoproteína de envoltura gp120.	39
1.6.2 Glicoproteína de envoltura gp41.	42
2. OBJETIVOS.	44
2.1 Objetivo General.	44

2.2 Objetivos Específicos.	44
3. MATERIALES Y METODOS.	45
3.1 Tipo de Estudio.	45
3.2 Población de estudio.	45
3.3 Criterios.	45
3.3.1 Criterios de Inclusión.	45
3.3.2 Criterios de Exclusión.	46
3.4 Recolección de las muestras.	46
3.5 Extracción de ADN.	46
3.6 Amplificación de la Región C1-C5.	47
3.7 Amplificación de la región C2-V3-C3.	48
3.8 Electroforesis.	49
3.9 Secuenciación del ADN.	49
3.10 Análisis y alineamiento de las secuencias.	49
3.11 Diagrama de Actividades.	50
4. RESULTADOS.	51
4.1 Características Epidemiológicas de la Población en Estudio.	51
4.2 Análisis y Alineamiento de las secuencias de la Región V3.	55
4.3 Residuos de cisteína.	56
4.4 Corona de la región V3.	56
4.5 Sitios de glicosilación.	58
4.6 Tropismo viral y empleo de correceptor.	59
5. DISCUSIÓN.	61
BIBLIOGRAFIA.	68
ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación taxonómica de los retrovirus según el Comité Internacional de Taxonomía viral	19
Figura 2. Relación filogenética entre VIH – 1 y VIH – 2, según gen <i>pol</i> .	20
Figura 3. Esquema general de la estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana y distribución de las proteínas que	24
Figura 4. Modelo de unión a la membrana por el dominio N-terminal de MA.	25
Figura 5. Proteína de la cápside (CA).	26
Figura 6. Replicación del HIV-1.	27
Figura 7. Procesamiento proteolítico de Gag del HIV-1 por parte de PR.	28
Figura 8. Estructura de los monómeros de los dominios de la integrasa del VIH-1.	29
Figura 9. Transcripción Reversa del genoma del VIH-1.	31
Figura 10. Transcriptasa reversa unida al sustrato ADN–ADN.	32
Figura 11. Proteasa del VIH-1 libre en una configuración abierta.	33
Figura 12. Estructura de la gp120 del VIH-1.	39
Figura 13. Esquema estructural de la gp120 del VIH-1.	40
Figura 14. Representación de la gp41.	41
Figura 15. Organización del genoma del VIH, ilustrando la posición de las regiones codificantes.	47
Figura 16. Distribución de la orientación sexual entre la población encuestada.	52
Figura 17. Distribución del tipo de práctica sexual entre la población encuestada.	53
Figura 18. Distribución de individuos según tiempo de diagnóstico en la población encuestada.	54
Figura 19. Electroforesis.	55
Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del bucle V3 de la proteína de envoltura del VIH, comparadas con la secuencia consenso.	58
Figura 21. Secuencia consenso del bucle V3 de la proteína de envoltura del VIH.	59

Figura 22. Conservación de los residuos aminoacídicos de la secuencia de V3 correspondiente a 42 individuos de la Costa Atlántica **60**

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Datos epidemiológicos y clínicos de los 13 individuos con mutaciones en las posiciones 11 y/o 25 del bucle V3 del VIH-1.	61

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxiribonucleico.

ARN: Acido ribonucleico.

CA: Cápside.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

FRC: Formas recombinantes circulantes.

gp: Glicoproteína.

IFN- γ : Interferon gamma.

IN: Integrasa.

LTR: Long terminal repeat.

MA: Matriz.

NC: Nucleocápside.

ORF: Open Reading Frame.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PIC: Complejo de preintegración.

Rev: Regulador de la expresión viral.

RRE: Rev response element.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SOCS-2: Suppressor of cytokine signaling-2.

SP: Péptidos espaciadores.

TAR: Transactivation response element.

Tat: Transactivador transcripcional.

TR: Transcriptasa reversa.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), una enfermedad asociada a desórdenes neurológicos, inmunológicos y gastrointestinales caracterizados por infecciones oportunistas, diarrea crónica, tumores malignos y demencia progresiva. El VIH, muestra un alto grado de variabilidad genética producto de la rápida replicación viral, fenómenos de recombinación, una elevada tasa de mutación debida a errores de la transcriptasa reversa, selección natural producto de la presión del sistema inmune y protocolos terapéuticos. Se ha determinado que la distribución universal de los diversos subtipos del VIH está relacionado con las regiones geográficas, es decir que la posibilidad de encontrar a un subtipo va a ser siempre más alta en regiones establecidas. En el presente trabajo se muestran los resultados de una caracterización molecular correspondiente a la región V3 de la envoltura del VIH-1 tomada de virus circulantes en una región de la costa Caribe colombiana e igualmente se presentan las características epidemiológicas de la población estudiada. Para tal propósito, muestras de sangre periférica de 80 individuos VIH positivos, cuya infección fue confirmada por western blot, fue utilizada para aislar el ADN viral. Utilizando PCR anidada fue amplificada la región de la envoltura viral correspondiente al dominio C2-V3-C3. Los subproductos de la PCR fueron secuenciados utilizando un analizador genético ABI 3130 marca Applied Biosystems y analizados posteriormente utilizando el programa 4Peaks para obtener la secuencia de aminoácidos. De las 80 muestras se logró amplificar la región viral V3 en 42 individuos y se logró obtener la secuencia en aminoácidos en igual número de muestras. Se encontró una alta estabilidad en las secuencias de la región correspondiente al motivo GPG (Residuos 15 al 17, correspondiente a las posiciones 310 a la 312 de la glicoproteína de envoltura, gp120) y se verificó la conservación de los residuos de cisteína en las posiciones 1 y 35, al igual que el motivo S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D en la mayoría de las muestras. Solamente 13 muestras (30.96%) presentaban cambios de aminoácidos sin carga por aminoácidos con carga positiva en la posición 11 y/o 25 (posiciones 306 y 320 de la glicoproteína gp120) determinantes del tropismo viral/ uso de correceptores. Esas muestras correspondían a pacientes con más de dos años de infección, un conteo bajo de linfocitos T CD4⁺ (< 200/μL) y una carga viral elevada.

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, mediante convenio No 418-2004 UNINORTE-COLCIENCIAS.

Palabras clave: VIH, subtipos virales, secuenciación.

INTRODUCCIÓN.

El VIH es el agente etiológico del SIDA (1). Esta enfermedad se caracteriza por una incapacidad del sistema inmune de proteger al individuo contra microorganismos invasores. La inmunosupresión es debida predominantemente a una eliminación selectiva de los linfocitos ayudadores/inductores que expresan la molécula CD4, la cual actúa como el receptor para el virus (2) y está asociada a desórdenes neurológicos (3), inmunológicos y gastrointestinales caracterizados por infecciones oportunistas, diarrea crónica, tumores malignos y demencia progresiva (4, 5).

Posee un genoma que consiste en dos copias de ARN monocatenario, no complementarias y de polaridad positiva, referido como pseudodiploide y que codifica enzimas como la Integrasa, la Proteasa y la Transcriptasa Reversa (TR). El VIH es genéticamente tan heterogéneo que debe ser descrito en términos de poblaciones relacionadas pero con genomas que poseen diferencias secuenciales (6, 7, 8) acuñándose el concepto de cuasiespecies (9, 10, 11). La alta diversidad genética del VIH se ha constituido en un gran desafío para la vigilancia y el control de la enfermedad. El resultado de esta heterogeneidad es la presencia de múltiples subtipos del VIH circulando en diferentes partes del mundo (12, 13). La sustitución de nucleótidos, supresiones, inserciones y reordenamientos resultantes de eventos de recombinación son los factores que desembocan en una variación del genoma del VIH. Todos estos procesos combinados contribuyen activamente a

la diversidad y virulencia del virus y por ende a la pandemia del SIDA. La información referente a las secuencias virales obtenidas a partir de virus aislados a través del mundo ha permitido la realización de análisis filogenéticos que concluyeron en la clasificación del virus en subtipos (o “clades”). El VIH-1, basándose en la secuencia nucleotídica y análisis filogenético de los genes *env* y *gag*, está dividido en tres grupos: El grupo mayor o M y dos grupos menores llamados N y O. El grupo M está dividido en 9 subtipos genéticos nombrados desde la A hasta la D, desde la F hasta la H, la J y la K (14, 15, 16, 17). Como consecuencia de la recombinación de genomas heterogéneos, también se pueden encontrar Formas Recombinantes Circulantes (FRC), que son virus con secuencias derivadas de dos o más subtipos (18). Los primeros estudios realizados fueron basados en información obtenida en países occidentales en donde predominaban sólo ciertos subtipos. La inclusión de países en vía de desarrollo por parte de la Organización Mundial de la Salud en futuros programas de evaluación de vacunas ha desviado la atención hacia países del área subsahariana, permitiendo identificar nuevos subtipos virales en dichas áreas (19). La gran variabilidad del VIH requiere que un monitoreo mundial de la distribución geográfica de los diferentes subtipos sea realizado con el fin de desarrollar vacunas anti-VIH que posean una vasta efectividad. El principal objetivo de este trabajo es caracterizar desde el punto de vista molecular al Virus de la Inmunodeficiencia Humana circulante en la región Caribe amplificando la región V3 correspondiente al gen *env* del VIH a partir del virus aislado de una población de pacientes infectados del área metropolitana de Barranquilla utilizando técnicas

de PCR y secuenciación del ADN. Esta información es de gran importancia debido a que ella podría ser utilizada para el desarrollo y la evaluación de futuros programas de vacunación anti-VIH empleando una vacuna diseñada contra los mismos epítopes frecuentes en nuestra región, el estudio de nuevos medicamentos antirretrovirales y el diseño de pruebas diagnósticas para el virus circulante. Las diferencias genéticas y fenotípicas en el VIH, en adición a su diferente comportamiento en la respuesta a la terapia y a la vacuna, proveen una visión más clara acerca de la situación prevalente de la actual epidemia del VIH-1 en Colombia y al mismo tiempo plantean interrogantes importantes acerca de si dichas diferencias podrían afectar la transmisibilidad, la infectividad y la patogenicidad viral.

1. MARCO TEORICO

1.1 Clasificación taxonómica.

El VIH pertenece a la gran familia de virus de los Retroviridae. Esta familia está conformada por un grupo diverso de virus que infectan a casi todos los vertebrados (ver figura 1). Su replicación es interesante, pues exhiben un patrón de comportamiento que los permiten diferenciar de otros virus (22). Este comportamiento consiste en que poseen una enzima llamada transcriptasa reversa, que puede usar las porciones del genoma de cada ARN del virión como molde para generar un ADN viral que luego será integrado al genoma de la célula y servirá para la síntesis del ARN viral y la traducción de proteínas que se ensamblaran para generar nuevos virus con capacidad infectante.

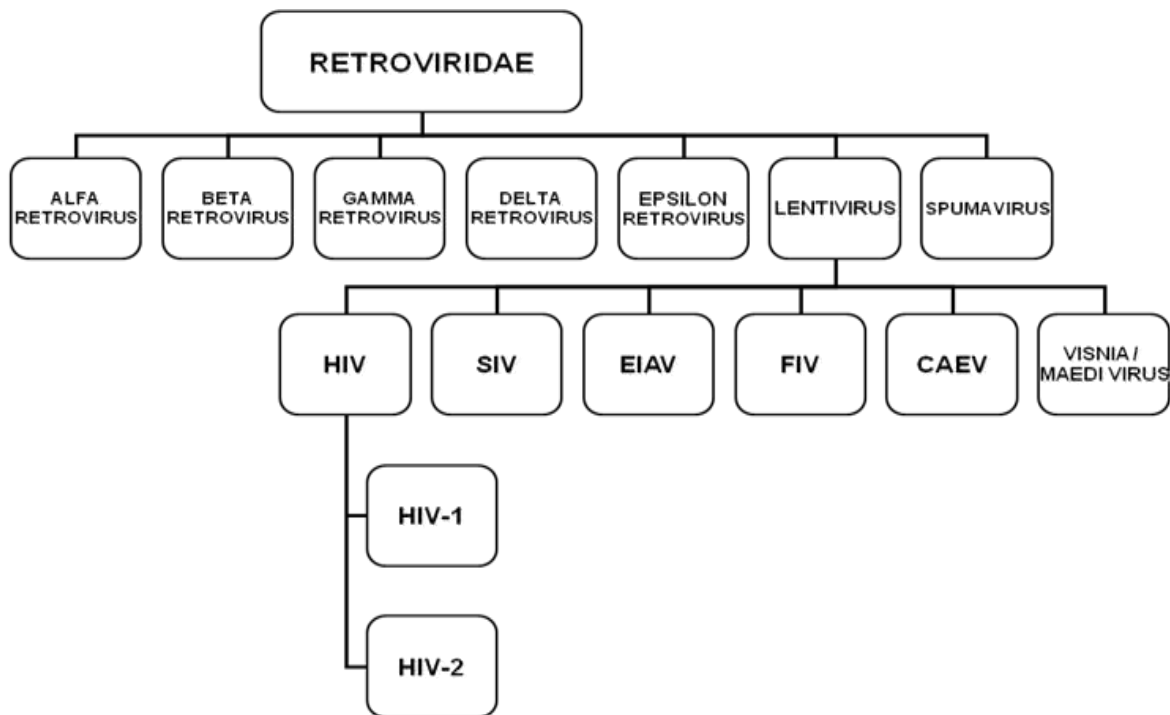


Figura 1: Clasificación taxonómica de los retrovirus según el Comité Internacional de Taxonomía viral.

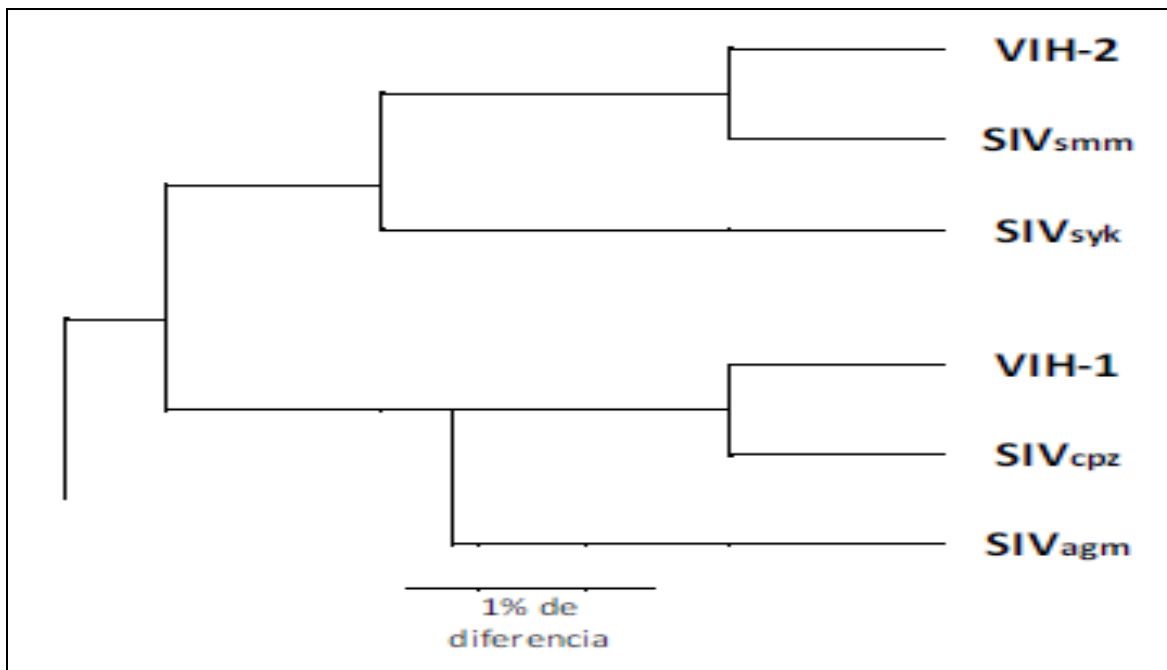


Figura 2: Relación filogenética entre VIH – 1 y VIH – 2, según gen *pol*. Se muestran cuatro grupos de lentivirus de primates no humanos, el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio *Sooty mangabey* (SIV_{smm}), Sykes (SIV_{syk}), Chimpancé (SIV_{cpz}) y African green monkey (SIV_{agm}). El VIH – 2, está más relacionado al SIV_{smm} y el VIH – 1 está más relacionado al SIV_{cpz}.

La familia de Retroviridae está constituida por siete géneros con una estructura genómica bien diferenciada: de una parte están los *Alfaretrovirus*, *Betaretrovirus* y *Gammaretrovirus* considerados virus simples pues sólo codifican los productos Gag, Pro, Pol y Env; de la otra encontramos los *Deltavirus*, *Epsilonvirus*, *Spumavirus* y *Lentivirus* considerados virus complejos pues poseen marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en ingles Open Reading Frame) que les permite generar una serie de proteínas auxiliares como Nef, Vpu, Vpr y Vif. El VIH-1 y el VIH-2 pertenecen al género de los Lentivirus. El VIH-2 fue descubierto en 1986 en el este de África y no es tan agresivo como el VIH-1; además el VIH-1 y el

VIH-2 no tienen un ancestro común, sino que provienen de virus aislados del Chimpancé (*Pan troglodytes*) y del Macaco (*Cercocebus atys*) respectivamente, y presentan cierta distancia filogenética (ver figura 2) (23).

1.2 Subpoblaciones heterogéneas y formas recombinantes circulantes (FRC).

La recombinación entre genomas de retrovirus fue primeramente demostrada durante infecciones mixtas de Virus Tumoral Aviar (24) y Virus de la Leucemia Murina (25) y más recientemente con retrovirus humanos (26). Aunque la recombinación puede ocurrir en todos los viriones, solamente una progenie genéticamente diferente puede ser generada a partir de viriones con dos diferentes ARNs (viriones heterocigotos), no a partir de viriones con idénticos ARNs, es decir viriones homocigotos (27). Los viriones heterocigotos son solamente generados a partir de células infectadas con más de un retrovirus (doble infección). Se ha demostrado que la doble infección ocurre frecuentemente en células T y células T primarias cultivadas, ofreciendo las bases para la generación de viriones heterocigotos que permiten observar frecuentes recombinaciones (28). Los estudios de individuos infectados con más de un VIH-1 genéticamente diferente revelan que esos pacientes también tienen virus híbridos en su población viral (29, 30, 31, 32). Dos características de estos virus son (I) que el fenotipo biológico de genomas individuales pueda ser diferente y (II) que por virtud de su complejidad, las quasispecies puedan adaptarse rápidamente a nuevos ambientes por selección de una variante. Existe amplia información disponible para demostrar que las características del VIH son concordantes con

esta descripción. Se ha mostrado que provirus infecciosos difieren sustancialmente en sus propiedades biológicas (33, 34). Los estudios de individuos infectados con más de un VIH-1 genéticamente diferente revelan que esos pacientes tienen virus híbridos que a lo largo de su genoma tienen múltiples puntos mutados y causan epidemias en ciertas áreas geográficas. Para reportar oficialmente una nueva forma recombinante circulante, es necesario documentar al menos tres aislamientos virales sin relación epidemiológica que presente idénticas secuencias mosaico y por lo menos dos de estos deben estar genéticamente caracterizados en su totalidad (35). En África occidental entre el 60% y el 84% de los aislamientos reportados como A, corresponden en realidad a recombinantes circulantes (A/G) (36), estas FRC han sido detectadas en países como Cuba y Portugal debido, probablemente, por la actividad migratoria (37, 38). En Bombay-India, se realizó un análisis genético en el que confirmó la existencia de una infección dual por VIH-1/VIH-2 en una cohorte de pacientes muestreados desde enero de 1992 hasta Septiembre de 1993. El análisis filogenético reveló una estrecha relación entre ambos tipos de virus, datos que eran consistentes con el patrón de contagio de una fuente común de entrada en la población de estudio y el predominio del subtipo C según las secuencias del gen *env* (39). Sin embargo, previos estudios sugieren que el VIH-2 es menos patogénico que el VIH-1 y no es transmitido con eficiencia (40). Al norte de la India, en la provincia de Heilongjiang-China, se demostró en 19 muestras secuenciadas, la desproporcionada presencia del subtipo B' junto con los A, B', B, C, FRC_BC, (FRC07_BC, FRC_08BC), FRC01_AE y FRC02_AG convirtiendo a China en el país con la mayoría de los

subtipos de VIH-1 (41), el mismo subtipo también es encontrado en la provincia de Yunnan (42) y Henan (43, 44). La FRC01_AE fue originalmente identificada en Tailandia (45, 46) y la FRC07_BC, FRC_08BC ha sido identificada entre usuarios de drogas intravenosas (UDI) en China (47, 48). La ruta de entrada del subtipo B predominante en Yunnan, fue por Europa y Estados Unidos pero este subtipo ha sido desplazado por el subtipo B' el cual es una variante del subtipo B, también llamada Thai-B (49, 50, 51). En Norteamérica predomina el subtipo B y se cree que el incremento en la frecuencia de otras FRC es consecuencia de procesos migratorios originados en regiones con predominancia de subtipos no B (52). En Argentina (53, 54), Bolivia (55), Venezuela (56, 57), Uruguay (58, 59), Perú (60) y Paraguay (61), se presenta la prevalencia del subtipo B y escasamente subtipos F, C y FRC. Brasil es el país suramericano que reporta la mayor variabilidad de subtipos de VIH-1. Hasta la fecha han sido reportados los subtipos B, C, D (62, 63), F (64), la FRC CRF02_AG (65) y coinfecciones (66). En Colombia hay estudios que muestran al subtipo B como el predominante (20, 21, 67), sin reportar FRC ni subtipos no B.

1.3 Las proteínas del VIH.

Debido al rol que desempeñan en la biología del virus y a la importancia en su infectividad y patología, las proteínas del VIH serán consideradas en forma individual a lo largo de la presente revisión.

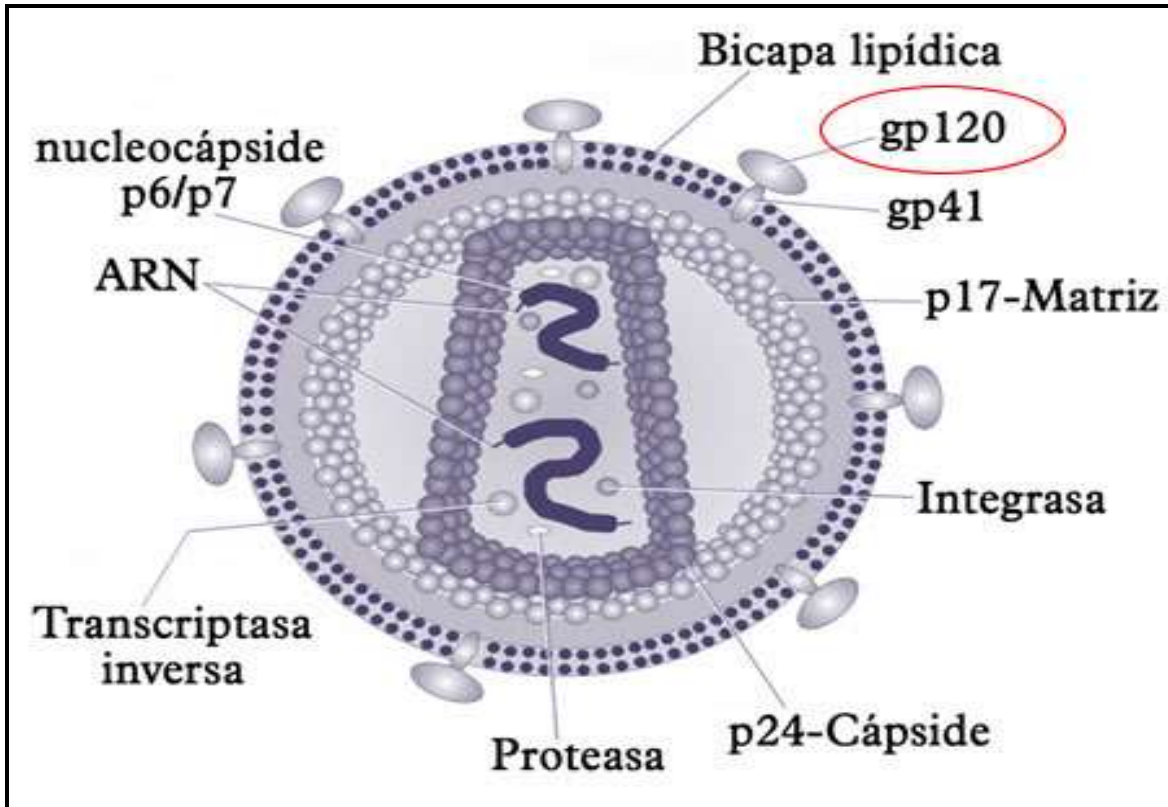


Figura 3: Esquema general de la estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana y distribución de las proteínas que forman la partícula viral (68).

1.3.1 Proteínas de estructura.

Las proteínas estructurales del VIH son derivadas de la poliproteína Gag, una proteína miristilada. La proteasa viral es activada durante el ensamblaje e hidroliza a Gag para generar péptidos espaciadores SP1 y SP2 y nuevas proteínas tales como la matriz (MA), que permanece asociada a la cara interna de la envoltura

lipídica viral; la nucleocápside (NC), unida al genoma viral; la cápside (CA), que forma una estructura cónica que rodea a la nucleocapside, a la transcriptasa reversa, a la integrasa y por último a la p6 (69).

1.3.2 La proteína de la Matriz (MA).

MA tiene un dominio que muestra una región conservada de aminoácidos básicos hacia la región N terminal. Hacia el lado C terminal los aminoácidos forman un motivo α -hélice que se proyecta lejos del dominio globular. La unión a la membrana se realiza mediante la inserción del grupo miristílico y el dominio básico en la bicapa lipídica particularmente a PI que es un fosfoinositósido altamente concentrado en la membrana plasmática (Ver figura 4) (70, 71).

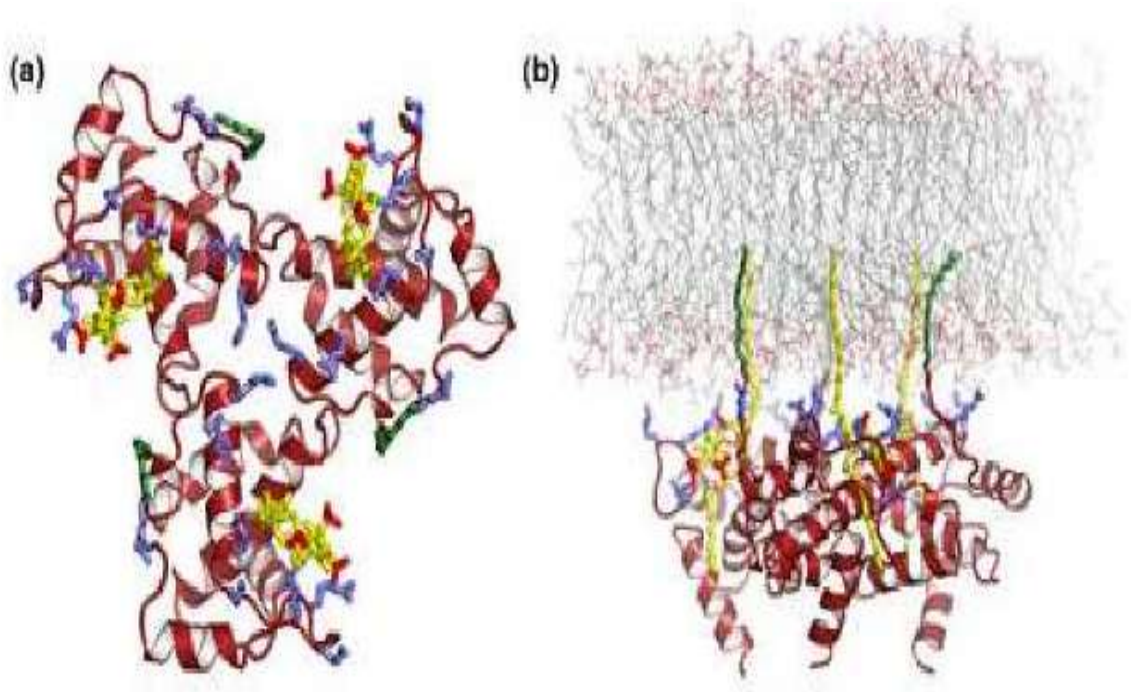


Figura 4. Modelo de unión a la membrana por el dominio N-terminal de MA. La figura es mostrada en una vista superior (a) y una vista lateral del trímero de MA unido a la bicapa lipídica (b), con la cadena de ácido miristílico coloreada en verde e insertada en el lado interno y los residuos básicos (azules) interactuando con ácido fosfolipídico, incluyendo PI(4,5)P (en amarillo)

1.3.3 La proteína de la cápside (CA).

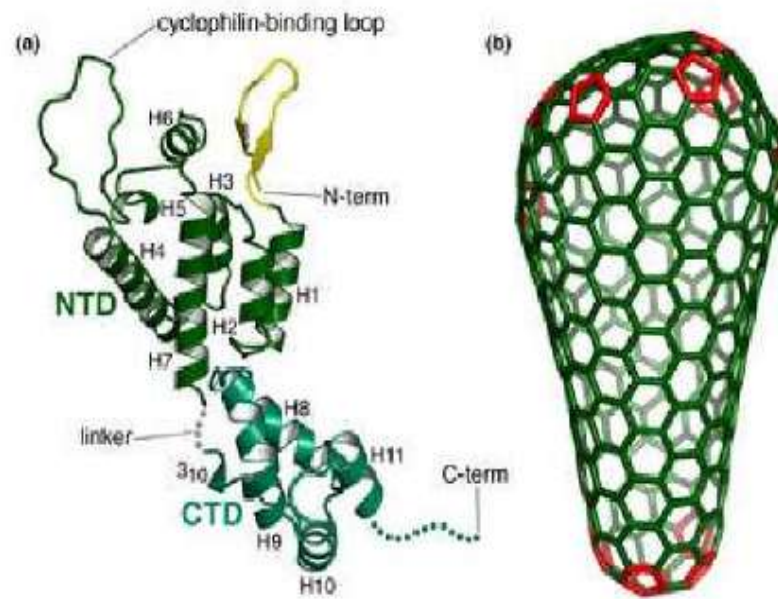


Figura 5: Proteína de la cápside (CA). (a) Estructura terciaria de la cápside madura, el dominio N terminal esta coloreado en verde y el dominio C terminal esta coloreado en verde claro. (b) Modelo de cápside cónica compuesta por hexágonos, notese que al final hay declinaciones pentagonales en color rojo.

La cápside está compuesta por dos dominios: el C terminal, el cual representa un tercio de la proteína y el dominio N terminal que está compuesto de siete α -hélices. Entre las hélices 4 y 5 del dominio N terminal, se encuentra un bucle en el cual se une la prolyl isomerasa, ciclophilin A, que es una proteína celular incorporada en el virion (Ver figura 5). Mutaciones en la proteína de la cápside producen varios fenotipos virales: aquellas que se producen en el dominio C terminal presentan virus con ensamblaje defectuoso, mientras que los cambios en el dominio N terminal generalmente no afectan la eficiencia de la producción del virus, pero pueden inhibir su propia maduración después de la liberación, afectando su capacidad infectante. El dominio C terminal de la cápside promueve

la multimerización de Gag, mientras que el dominio N terminal juega un papel importante en la condensación del núcleo y morfogénesis viral.

1.3.4 La proteína de la nucleocápside (NC).

Es un producto de la proteólisis inicial de la poliproteína Pr55Gag, la cual produce una proteína llamada p15NC, que está compuesta a su vez de p7NC, p1 (SP2), y p6 (72).

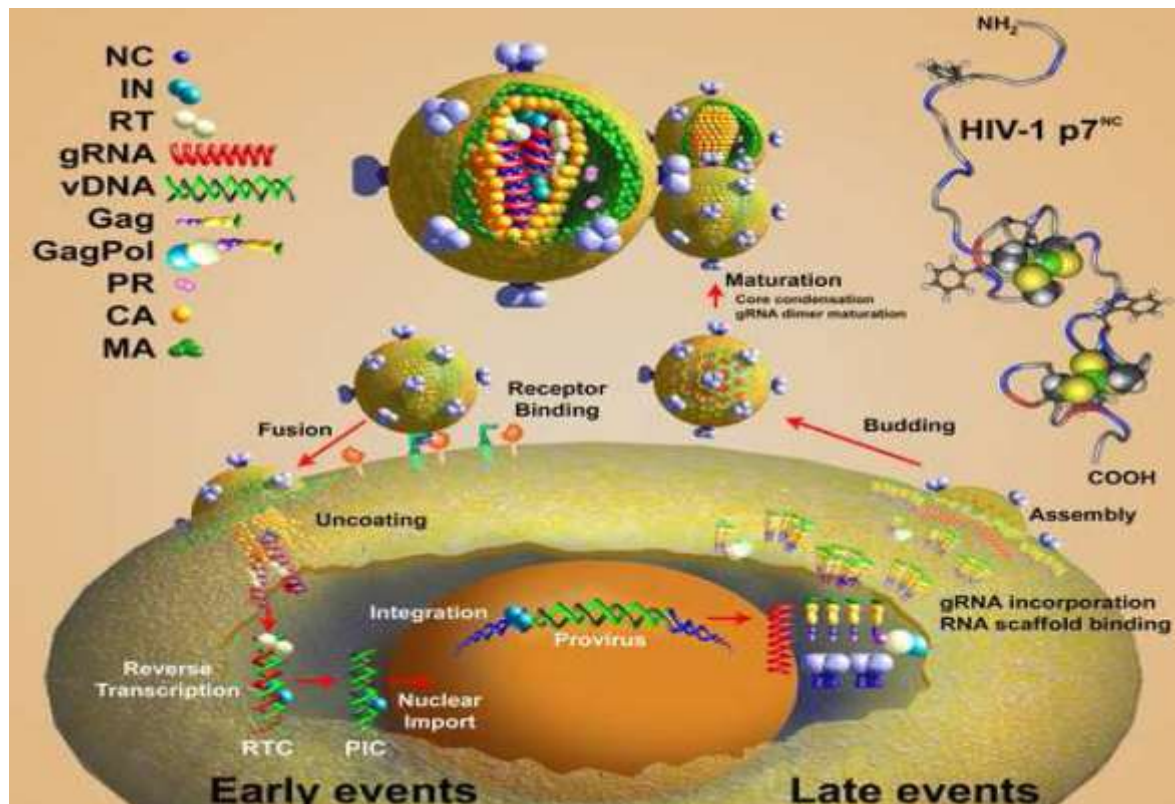


Figura 6. Replicación del HIV-1. Se muestra los numerosos lugares en los que NC participa. La estructura en la parte superior izquierda es tomada de Summers *et al.* (Lee et al., 1998), y muestra la localización de los residuos aminoacídicos básicos y ácidos coloreados en azul y rojo respectivamente. El ion zinc está coloreado en verde.

NC es necesaria para la replicación viral, para la unión al ARN viral, la cual facilita la interacción de otras regiones de Gag con membranas celulares. También es requerida para el reconocimiento y empaquetamiento del genoma viral. En los eventos de infección temprana actúa como una chaperona y hasta la fecha la

nucleocápside del VIH-1 es la proteína a la cual se ha asociado la más efectiva actividad de chaperona ya que tiene la propiedad de desestabilizar las hélices de Ácidos nucleicos y producir agregación de éstos. Facilita la conversión del ADN de hebra sencilla a ADN de doble hebra. Se ha reportado que mutaciones en la Nucleocápside pueden causar efectos en el ensamblaje de partículas virales, empaquetamiento del ARN genómico, maduración del dímero de ARN, transcripción reversa e integración (Ver figura 6).

1.3.5 La proteína p6.

La p6 es una pequeña proteína rica en prolina con un peso molecular de 6 kD, ubicada al extremo C terminal de la poliproteína Pr55^{Gag} (Ver figura 7).

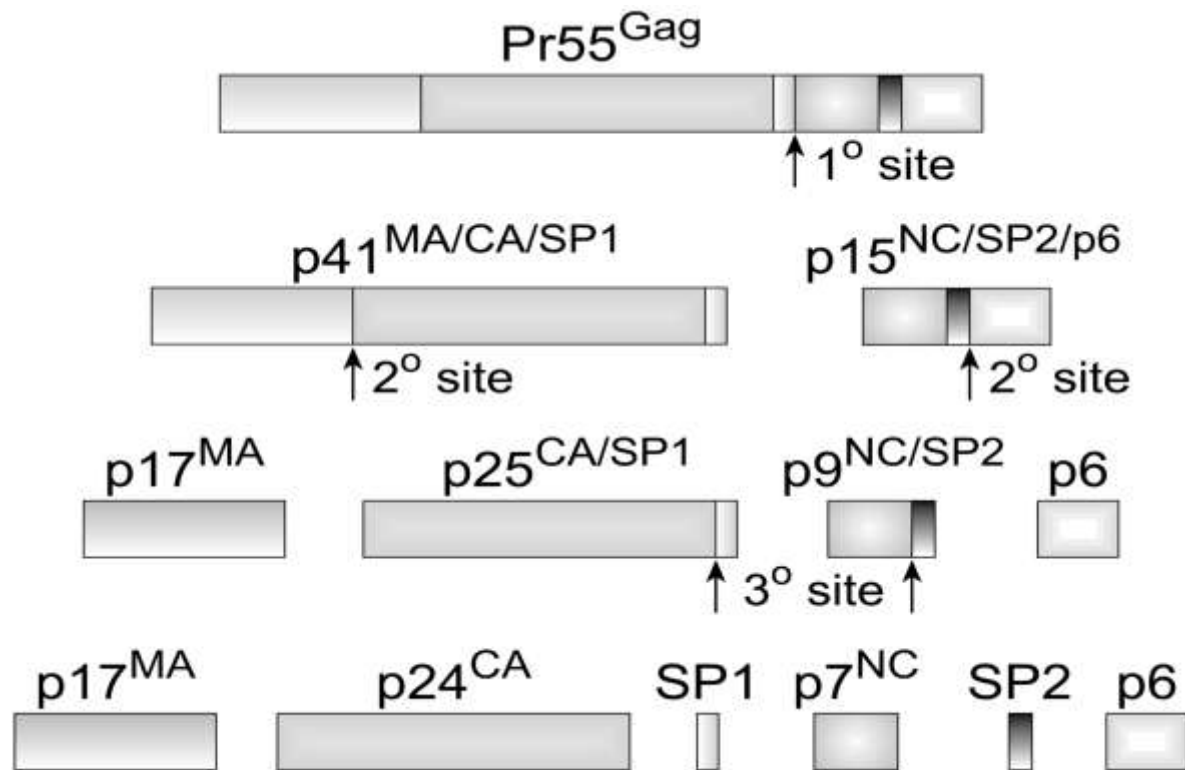


Figura 7. Procesamiento proteolítico de Gag del HIV-1 por parte de PR. La proteólisis inicial se lleva a cabo entre SP1 y el dominio de NC. Durante la proteólisis, NC se encuentra en dos formas intermediarias, p15NC (la hidrólisis parcial contiene NC/SP2/p6), p9NC (la hidrólisis parcial contiene NC/SP2) y la forma procesada definitiva, p7NC.

Mutaciones en p6, en el motivo altamente conservado Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP), bloquean un último paso del ensamblaje viral. Los viriones resultantes se acumulan en la membrana citoplasmática pero fallan al momento de salir no haciéndolo eficientemente. La p6 también funciona directamente en la incorporación de Vpr y Vpx dentro del virus (73).

1.4 Las enzimas virales.

1.4.1 Integrasa.

La función de la Integrasa es integrar la doble hebra de ADN, resultante de la retrotranscripción, en el genoma de la célula hospedera. Este trabajo lo realiza en dos pasos, catalizados por tres residuos ácidos en el motivo característico D, D(35)E (dos aspartatos y un glutamato, el segundo aspartato está separado del glutamato por 35 aminoácidos) (Ver figura 8) (74).

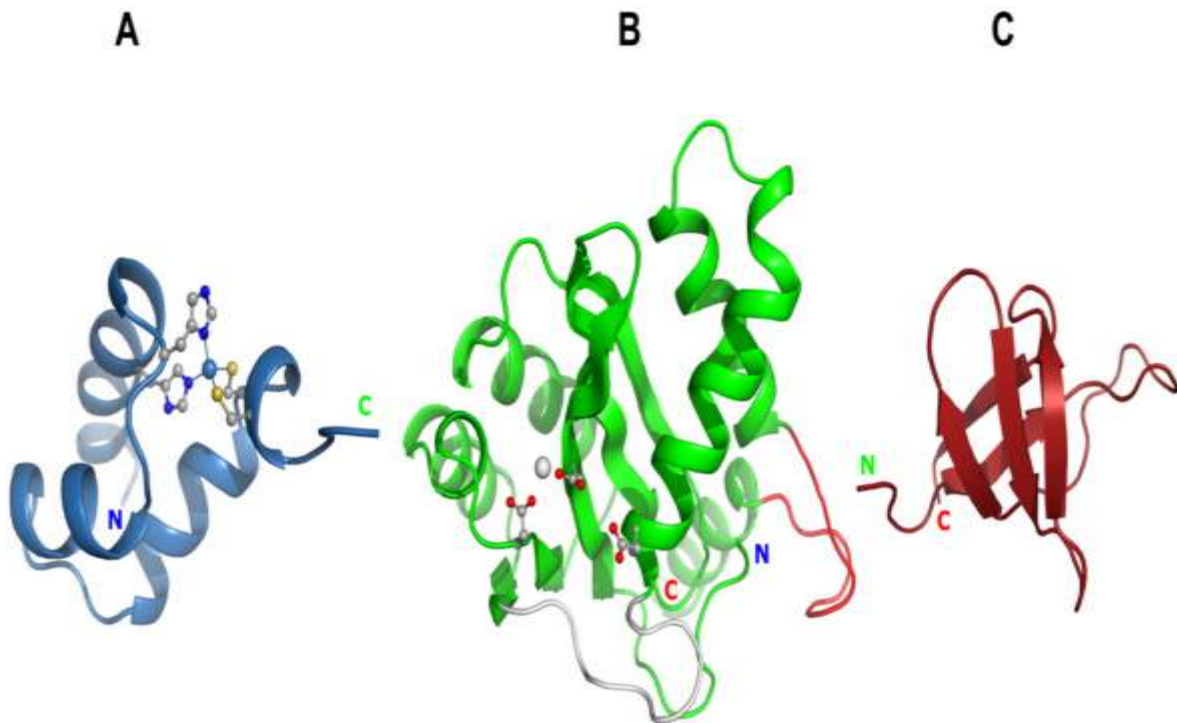


Figura 8. Estructura de los monómeros de los dominios de la Integrasa del VIH-1. (A) el dominio N-Terminal (en azul) con un catión de Zn^{2+} (esfera grande) coordinado con un motivo HHCC. **(B)** el dominio C-Terminal (en verde), con el residuo catalítico D,D(35)E. **(C)** el dominio CTD (en rojo).

En el primer paso de la integración, la integrasa remueve dos nucleótidos terminales (G y T) en cada extremo 3' de cada hebra de ADN viral. En el segundo paso, hay un ataque nucleofílico al extremo 3'OH libre del ADN celular por parte del ADN viral, resultando en su integración completa. También participan en el proceso de integración, proteínas y enzimas celulares formando un complejo llamado complejo de preintegración (PIC) compuesto también por las proteínas virales Transcriptasa Reversa y la MA (74).

1.4.2 Transcriptasa reversa (TR).

Esta enzima, es capaz de convertir el ARN monocatenario viral en ADN bicatenario, en las etapas tempranas de la infección (75). En ningún momento de la replicación de los retrovirus hay corrección de errores. En el VIH la TR es más propensa a cometer errores que ninguna otra transcriptasa reversa pues carece de un sistema de corrección (76).

La TR tiene tres actividades enzimáticas: (I) la polimerización de ADN, ARN dependiente; (II) degradación del ARN y del ARNt iniciador en el intermediario híbrido ARN-ADN y (III) polimerización del ADN, ADN dependiente. Además de los errores de la TR, la recombinación ha sido propuesta como fuente de la heterogeneidad viral. Dos modelos han sido propuestos para explicar la recombinación en retrovirus, la mayoría de ellos involucrando a la TR, pues la alta frecuencia de recombinación en los retrovirus ocurre durante la retrotranscripción de dos genomas diferentes encapsidados en la partícula del virión. Ambos modelos tienen en común la formación de viriones heterocigotos en la célula

infectada e intercambios genéticos durante la transcripción reversa en la siguiente estirpe celular y difieren en cómo ocurre el intercambio genético (77, 27).

Un primer modelo propone un mecanismo de elección de copia modificado en el cual la TR salta desde un ARN molde hasta otro y cae sobre rupturas en la hebra

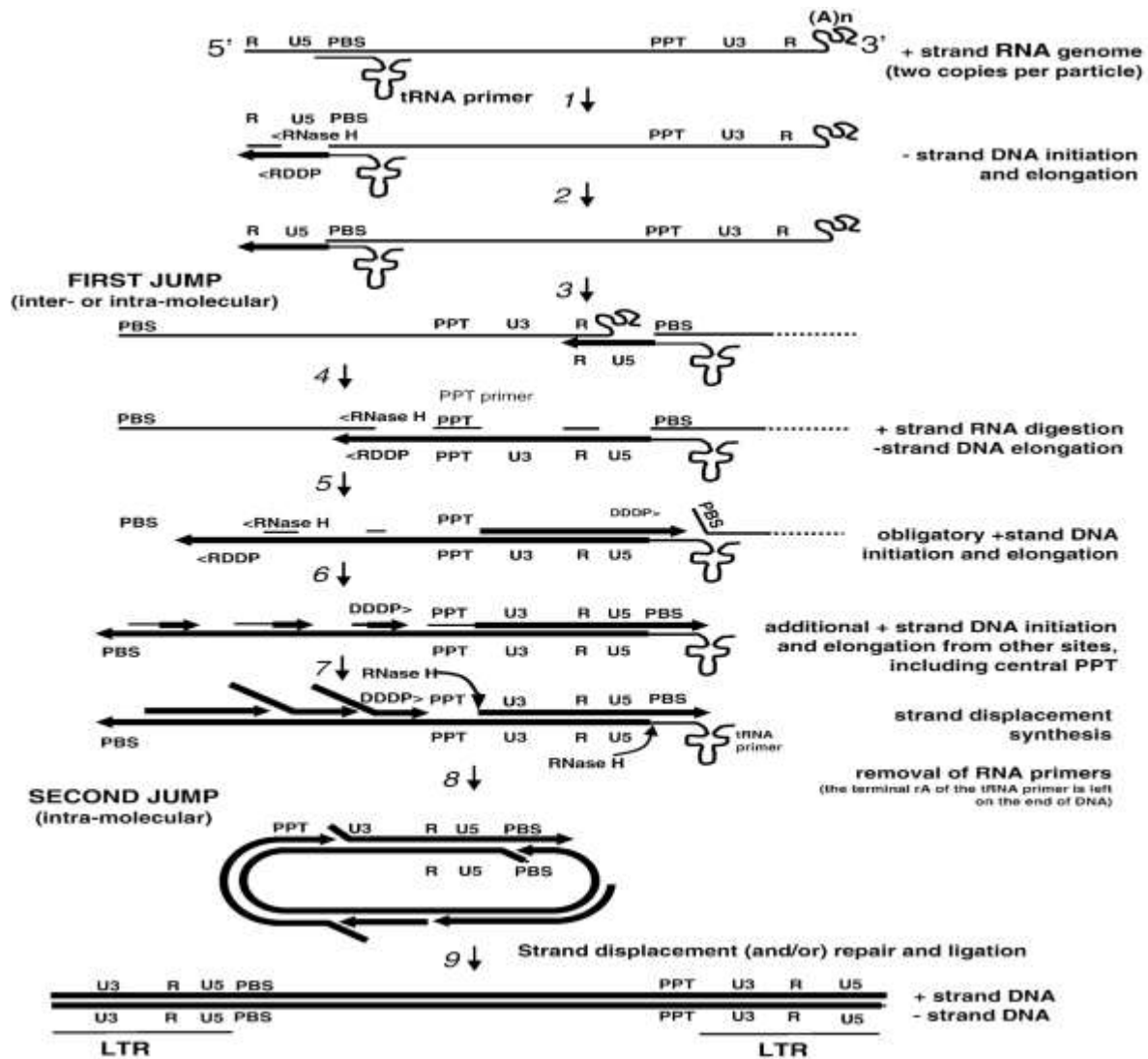


Figura 9. Transcripción Reversa del genoma del VIH-1. Tomado de Annual Review of Biochemistry.

de ARN y siempre permite un único provirus recombinante. El otro modelo alternativo, asume que dos genomas de ARN son retrotranscritos cada uno en dos hebras de ADN negativo y que las ramificaciones de cada hebra recombinan con

regiones homólogas sobre otro ADNc en un mecanismo de dislocación-asimilación y produce un heteroduplex recombinante parental de ADN, en el cual una hebra de DNA, es parental y la otra es recombinante (78). Reciente evidencia experimental en viriones heterocigotos (79) y transcriptasa reversa (80, 81, 82) es consistente con ambos modelos (Ver figuras 9 y 10).

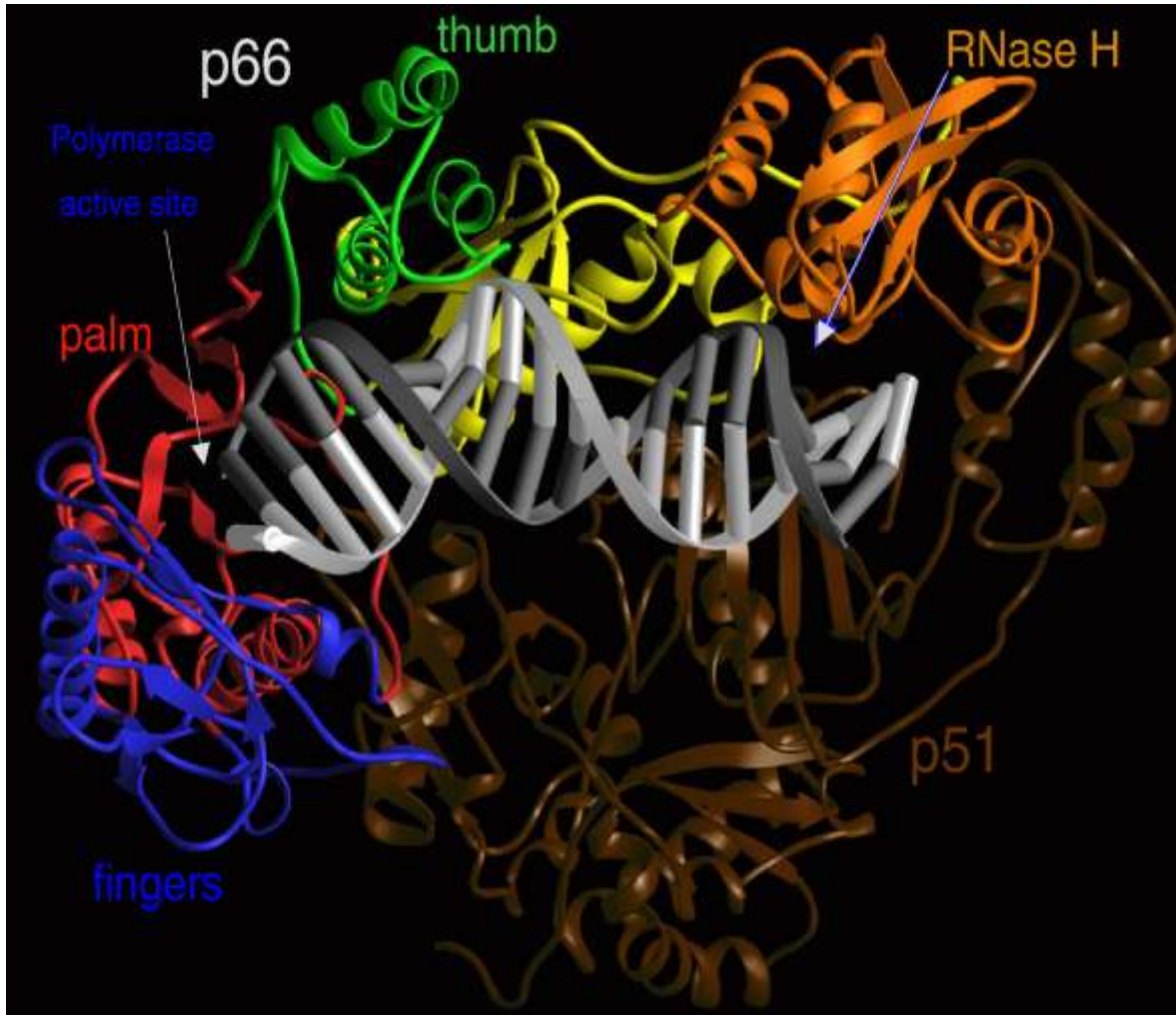


Figura 10. Transcriptasa reversa unida al sustrato ADN-ADN. Tomado de: Sarafianos, *et al.* 2009. (83).

1.4.3 Proteasa.

La proteína Gag, es una poliproteína que es hidrolizada para generar proteínas más pequeñas.

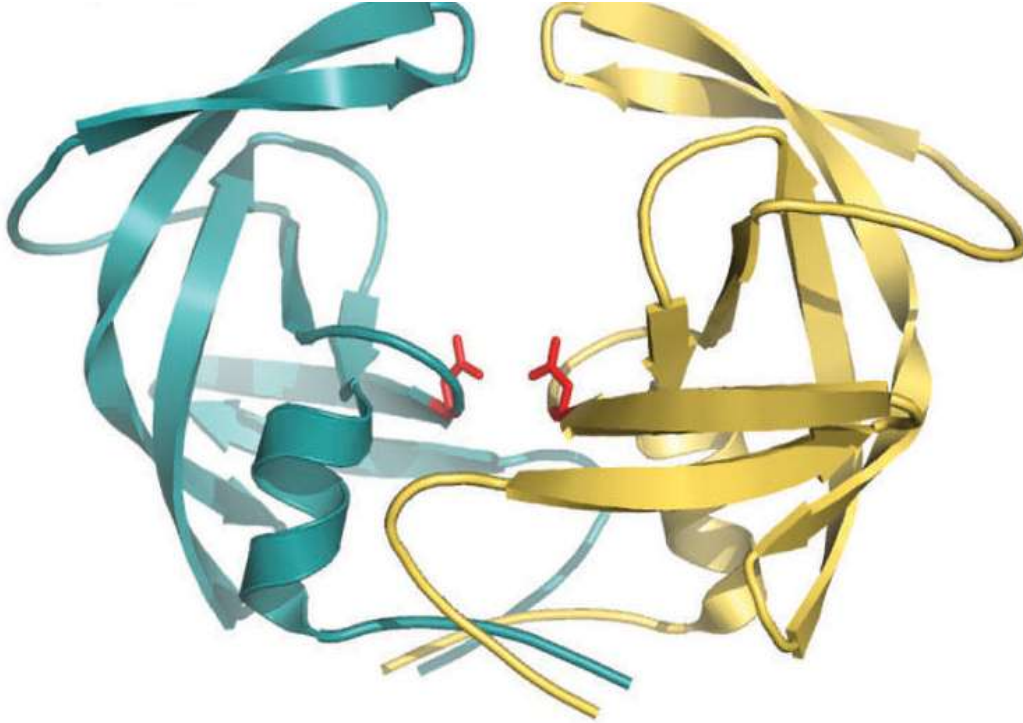


Figura 11. Proteasa del VIH-1 libre en una configuración abierta.

Dicha actividad es esencial para que el virus sea infeccioso y es realizada por una enzima viral que está muy relacionada a proteínas celulares como pepsina y renina. Esta enzima es la proteasa compuesta por cuatro cadenas β plegadas. Sus dominios N terminal y C terminal interactúan para producir un dímero activo (Ver figura 11). La actividad se lleva a cabo gracias a dos residuos opuestos de aspartato en el centro activo para coordinar una molécula de agua que cataliza la hidrólisis del enlace peptídico de la proteína blanco (84, 85).

1.5 Las proteínas auxiliares.

Los lentivirus, se diferencian de los otros retrovirus, porque poseen marcos de lecturas abiertos adicionales (ORF, del inglés Open Reading frame) que codifican para una serie de proteínas conocidas como proteínas auxiliares. Estas proteínas se clasifican en dos grupos: las proteínas reguladoras y las proteínas accesorias.

1.5.1 Las proteínas reguladoras.

Las proteínas reguladoras reciben este nombre debido a que regulan la replicación viral y son esenciales para el ciclo de vida del VIH. Las proteínas Tat y Rev, controlan el ritmo de expresión y exportación del ARNm viral.

1.5.1.1 Tat (Transactivador transcripcional).

La principal función asignada a la proteína Tat es la de fungir como elemento transactivador de la transcripción de los genes virales. La expresión del ADN viral es un paso crítico en el ciclo replicativo del virus; para tal efecto unas proteínas conocidas como factores de transcripción se unen en ciertas regiones del ADN, estimulando el proceso de transcripción. Una vez avanzado el proceso de transcripción la proteína Tat se une al ARN neo-sintetizado interactuando con una estructura tipo asa que se forma en el ARN viral en transcripción y que está ubicada hacia el extremo 5' del transcrito viral en la región R del promotor LTR, conocida como TAR (*Transactivation response element*) (86). Seguidamente a esta unión, Tat induce una modificación de la cromatina al unirse con complejos de proteínas y desencadenar el reclutamiento de otras proteínas para formar un complejo ribonucleoproteico que aumenta la eficiencia de la ARN polimerasa II y favorece la elongación del ARN (87, 88). Tat también es un inmunomodulador

pues altera la respuesta inmune del hospedero cumpliendo un papel importante en la patogénesis del VIH-1, pues interfiere con la vía de señalización del receptor de IFN- γ . Tat actúa induciendo la actividad de la proteína supresora de la señalización de citocina-2, SOCS-2 (*suppressor of cytokine signaling-2*) que impide la fosforilación de STAT1 y la consecuente transcripción de genes específicos regulados por el IFN- γ , alterando y favoreciendo la supervivencia del virus. Tat se ha relacionado con el daño de la función neuronal observado en la demencia asociada a la infección por VIH-1. Tat tiene además efectos proinflamatorios y puede hacer parte de los mecanismos responsables de la eliminación de linfocitos T induciendo la muerte de las células T CD4+ a través de múltiples vías apoptóticas (89).

1.5.1.2 Rev (Regulador de la expresión viral).

La función asignada a Rev es transportar a los transcritos virales entre el núcleo y el citoplasma. Rev es sintetizada en el citoplasma y luego pasa al núcleo donde interactúa con la secuencia RRE (del inglés *Rev response element*) presente en los transcritos virales semiprosesados y sin procesar; esta interacción favorece el reclutamiento de proteínas nucleares, entre ellas Crm1 y Ran-GTP, para formar un complejo de exportación que lleva los diferentes transcritos hacia el citoplasma, en donde serán traducidos por los ribosomas en proteínas estructurales y no estructurales del virus (90). Se ha descrito que Rev está presente en el espacio extracelular neuronal y que su presencia allí está relacionada con la demencia asociada a la infección por VIH-1 (91).

1.5.2 Las proteínas accesorias.

Las proteínas accesorias reciben este nombre debido a que no son indispensables para la replicación viral, ya que se ha demostrado *in vitro* que mutaciones que afectan la expresión de estas proteínas no interfieren en la replicación viral. No son comúnmente encontradas en otros retrovirus sin embargo, promueven la replicación viral, la transmisión y evasión de la inmunidad innata y adquirida de una manera eficiente.

1.5.2.1 Proteína Nef.

Es una proteína multifuncional (92), que es expresada abundantemente en las etapas tempranas de la infección (93). Ha sido asociada al mantenimiento elevado de la carga viral *in vivo*, ya que evita la superinfección de las células por parte de los virus liberados; al aumento de la multiplicación viral y a la infectividad viral (94). Es responsable también de la disminución de la expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I, contribuyendo a los mecanismos de persistencia y de evasión del sistema inmunitario del virus (95, 96, 97). Ha sido asociada con la disminución del receptor CD4 a nivel de la superficie celular (98), evitando el fenómeno de agregación viral producto de la interacción de CD4–gp120 de los virus nacientes (99). Finalmente, se ha determinado no ser esencial para la replicación viral en algunas células *in vitro* (100).

1.5.2.2 Proteína Vpu.

Vpu es una proteína integral de membrana que actúa junto con Nef en la inducción de la degradación de la molécula CD4. A diferencia de Nef, Vpu lleva a cabo la degradación de CD4 a nivel del Retículo Endoplasmático vía ubiquitina. Otra

función atribuida a Vpu es el aumento de la salida viral a partir de la membrana plasmática de las células infectadas (101). Vpu se encuentra exclusivamente en los virus VIH-1 y en el VIScpz, sin embargo, el VIH-2 contiene otro gen, el *vpx*, que codifica una proteína de 113 aminoácidos y que permite la infección de los macrófagos y la diseminación vírica (102, 103).

1.5.2.3 Proteína Vpr.

Es una proteína de fase tardía que está localizada en el núcleo de la célula y hace parte del complejo de preintegración junto con la integrasa, la matriz, la transcriptasa inversa, y ciertas proteínas celulares, que importa al ADN recién sintetizado hacia el núcleo (104). Se ha documentado que esta proteína aumenta la eficacia de infección en las células que no están en división, como los macrófagos (105), además de que puede ser un agente causal de la depleción de las células T CD4 mediante la inducción de apoptosis. Se ha sugerido que una forma de inducir la apoptosis es actuando como un factor soluble secretado por las células infectadas que induce directamente la permeabilización de la membrana mitocondrial por una interacción directa de Vpr con el Traslocador del Adenin nucleótido (ANT) (106, 107). Esta permeabilización permite la liberación de factores apoptóticos tales como citocromo c y el Factor de Inducción de Apoptosis (AIF). Otra forma de inducir la apoptosis es actuando indirectamente sobre la mitocondria y aumentando el nivel de la caspasa 9 implicada en la cascada apoptótica (108).

1.5.2.4 Proteína Vif.

Es una proteína ubicada en el citoplasma de la célula infectada y expresada en altos niveles. Se requiere para mantener la infectividad de las partículas virales libres (109), el mantenimiento de la morfología viral y evitar la disminución de las proteínas Gag y Pol de importancia en las etapas de ensamblaje y/o maduración viral (110). Finalmente, Vif contribuye a la síntesis del ADN proviral (111).

1.6 Las glicoproteínas de la envoltura.

Estas glicoproteínas, son el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes (112) y el diseño exitoso de una vacuna se ha visto complicado por la remarcable heterogeneidad de sus secuencias (113). La más alta heterogeneidad es encontrada en las regiones de la glicoproteína gp120 designadas como V1 a V5 y una consecuencia de esta variación, sería la evasión del sistema inmunitario por parte del virus (114). Las moléculas que constituyen las glicoproteínas de envoltura del VIH son: la gp120 y la gp41.

1.6.1 Glicoproteína de envoltura gp120.

La glicoproteína de envoltura del VIH-1 gp120 es la responsable de la unión del virus al principal receptor CD4, al igual que a otros correceptores tales como el CXCR4 y el CCR5 presentes mayoritariamente en los linfocitos T y en los macrófagos, respectivamente (Ver figura 12). La gp120 esta codificada por un ARNm bicistrónico y es generada por la hidrólisis de la glicoproteína gp160 por parte de una endopeptidasa celular llamada furina para producir gp120 (SU, superficie) y la gp41 (TM, transmembranal). Dicha hidrólisis es necesaria para inducir la actividad de fusión e incrementar la infectividad viral (115).

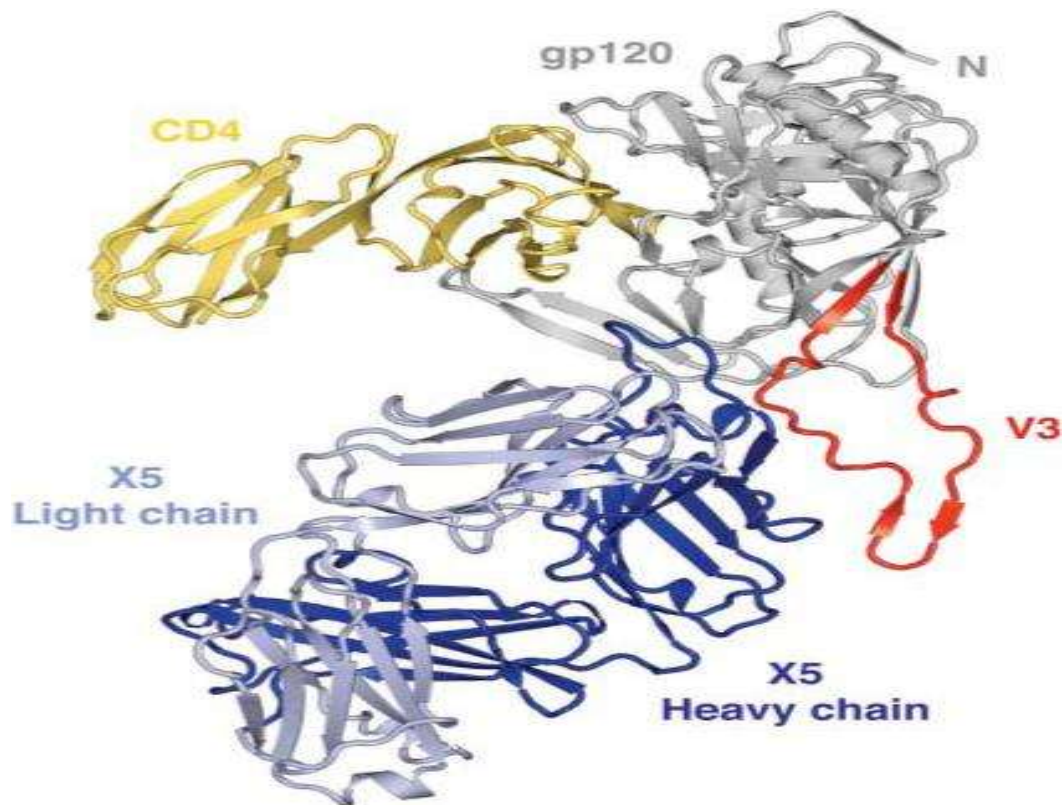


Figura 12. Estructura de la gp120 del VIH-1. La gp120 del VIH-1 es mostrada en color gris y la región V3 en color rojo. El receptor CD4 es mostrado en color amarillo junto con la porción Fab de un anticuerpo en azul claro y azul oscuro.

Particularmente, la gp120 es fuertemente glicosilada en motivos relativamente conservados hallados en el contexto N-X-S/T (N, representa Asparagina; X representa cualquier aminoácido, excepto Prolina; S, representa Serina y T, representa Treonina) con cadenas de oligosacáridos en un 50% aproximadamente, con el propósito de ocultarla y poder evadir al sistema inmunológico (Ver figura 13) (116).

1.6.2 Glicoproteína de envoltura gp41.

La gp41 es una proteína transmembranal que es codificada por el gen env. Tiene un peso molecular de 41 kD y, al igual que la gp120, es glicosilada. La gp120 interactúa con el receptor celular CD4 y con los correceptores CCR5 o CXCR4 el cual induce una cascada de cambios conformacionales en la gp120 y gp41. Como consecuencia de esto se aproxima la membrana celular y la envoltura viral para fusionarse (117).

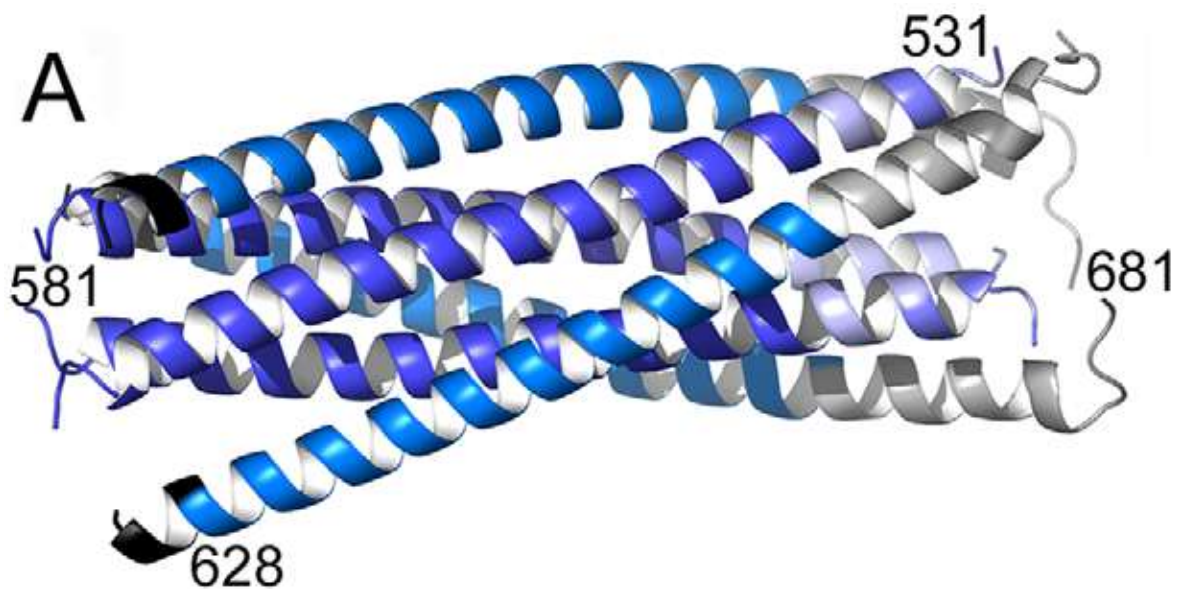


Figura 14. Representación de la gp41. Estructura cristalina compuesta desde los residuos 531 al 581 y 628 al 681 unidos para formar la región transmembranal y el péptido fusión.

La gp41 juega un papel muy importante en la fusión viral. El dominio extracelular de gp41 tiene tres regiones funcionales importantes: el péptido de fusión que está compuesto por residuos hidrofóbicos ricos en glicina que son importantes en la penetración inicial en la membrana de la célula diana, las hepta repeticiones N- y C-terminal que están compuestas por residuos hidrofóbicos que tienen la tendencia a formar hélices alfa y el péptido C que también puede unirse al péptido

fusión, bloqueando así su inserción en la membrana de la célula diana. La gp41 tiene una secuencia de aminoácidos ubicada en la región intracitoplasmática que actúa como señal de polarización/endocitosis al interactuar con la proteína Vpu. Dicha interacción determina la salida basolateral del virus hacia un polo determinado en linfocitos infectados. Por otro lado, la incorporación de Env dentro de la partícula viral se ve favorecida por la degradación de CD4 a nivel de la superficie de la célula infectada por Vpu, lo cual aumenta la infectividad viral (118).

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

Caracterizar la región V3 de la glicoproteína de envoltura (gp120) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana a partir de aislados de individuos infectados de la región Caribe colombiana.

2.2 Objetivos Específicos.

- 2.2.1** Determinar la secuencia de aminoácidos a partir de la secuenciación nucleotídica de la región V3.
- 2.2.2** Determinar al interior de la región V3, la conservación de aminoácidos y motivos relevantes y determinantes para la biología del virus.
- 2.2.3** Analizar las características poblacionales de los individuos participantes en el estudio.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Tipo de Estudio:

Se aplicó un diseño descriptivo transversal ya que en el estudio se hizo una caracterización del virus circulante en la Costa Caribe, en un tiempo definido, sin seguimiento posterior.

3.2 Población de estudio.

Ochenta individuos fueron seleccionados entre pacientes VIH positivos que acudían al Programa de Atención de pacientes de VIH de la Red Pública del Hospital General de Barranquilla y a la Institución Prestadora de Salud Centro de Medicina Integral y que aceptaron libremente participar en este estudio. Estos pacientes habían sido diagnosticados mediante la prueba de ELISA y confirmados mediante Western Blotting.

3.3 Criterios:

3.3.1 Criterios de inclusión:

- 3.3.1.1** Pacientes de ambos sexos y procedentes de la región Caribe del país.
- 3.3.1.2** Diagnóstico de VIH/SIDA mediante ELISA y confirmado por western-blotting.
- 3.3.1.3** Consentimiento informado por escrito y firmado por el paciente para participar en el estudio previa explicación del proyecto.

3.3.2 Criterios de exclusión:

3.3.2.1 Niños y adolescentes tempranos.

3.3.2.2 Personas con VIH/SIDA en fase terminal.

3.4 Recolección de las muestras.

Los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y daban su autorización mediante consentimiento informado eran sometidos a una extracción de 3 a 5 mL de sangre total periférica en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson Corp., Rutherford, New Jersey) que contenían EDTA. Las muestras eran transportadas en refrigeración a las instalaciones de la Universidad del Norte para su inmediato procesamiento.

3.5 Extracción de ADN:

Para obtener el buffy coat, los tubos eran centrifugados a 1000 RPM durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada Legend Mach 1,6R (Sorvall®). El ADN genómico total fue extraído del buffy coat usando el kit de extracción MasterPure DNA purification for blood versión II de Epicentre Biotechnologies® (Madison, Wisconsin). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, 300 µL del buffy coat eran mezclados con 1200 µL de solución de lisis de glóbulos rojos e incubados por 10 minutos y posteriormente centrifugados a 10000 RPM durante 25 segundos, el sobrenadante fue descartado. Luego, 600 µL de solución de lisis celular fueron agregados al precipitado, mezclados vigorosamente y adicionados con 250 µL de solución de precipitación de proteínas. Esta mezcla era centrifugada durante 10

minutos a 10000 RPM. El ADN contenido en el sobrenadante, era precipitado transfiriéndolo a un tubo eppendorf limpio y adicionado con 700 µL de etanol absoluto, grado Biología Molecular, marca Merck® y sometido a dos lavados con etanol al 70%. Las muestras de ADN eran rehidratadas en 200 µL de TE, según instrucciones del fabricante. Para determinar la pureza y concentración de los ADN obtenidos se empleó un espectrofotómetro Biomate 3 (Thermo Electron Corporation). Las muestras eran guardadas a -20° C hasta su posterior utilización.

3.6 Amplificación de la Región C1-C5:

2000 ng de ADN fueron añadidos a 5 µL de buffer de PCR 10X, 2.5 U de *Taq* polimerasa en 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 2 mM MgCl₂, 1% dimethyl sulfoxide y 1% glicerol, 5 pmol de cada cebador y 0.2 mM de cada desoxinucleotidotrifosfato, en un volumen final de 50 µL. Los cebadores utilizados fueron ED3 (5' **TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AAG CGG** 3') y ED14 (5' **TCT TGC CTG GAG CTG TTT GAT GCC CCA GAC** 3') que amplificaron un segmento de 2000 pb, correspondiente al primer exón del gen *rev* desde la posición 5960 hasta la región codificante de gp41 del gen *env* en la posición 7960 (Ver figura 15) (119). Un Control positivo era incluido en cada amplificación.

Las condiciones estándar de cada amplificación eran las siguientes: tres ciclos de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto. Seguidos de 32 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 minutos, 72°C por 1 minuto y un extensión final de 72°C por 5 minutos.

3.7 Amplificación de la región C2-V3-C3:

La segunda ronda amplificó un segmento de 500 pb correspondiente a la región C2-V3-C3 del gen *env* desde la posición 6820 hasta la 7378 (Ver figura 15). 2 µL de producto de la primera ronda de amplificación fueron añadidos a 2.5 U de *Taq* polimerasa en 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 2 mM MgCl₂, 1% dimethyl sulfoxide, 1% glicerol, 5 pmol/µL de cada oligonucleótido ED31 (5' **CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG** 3') y ED33 (5' **TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C** 3') (120) y 0.2 mM de cada desoxinucleotidotrifosfato, en un volumen final de 100 µL. El producto del Control positivo de la primera ronda de amplificación fue incluido. Las condiciones estándar de cada amplificación eran las siguientes: tres ciclos de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto. Seguidos de 32 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 minutos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

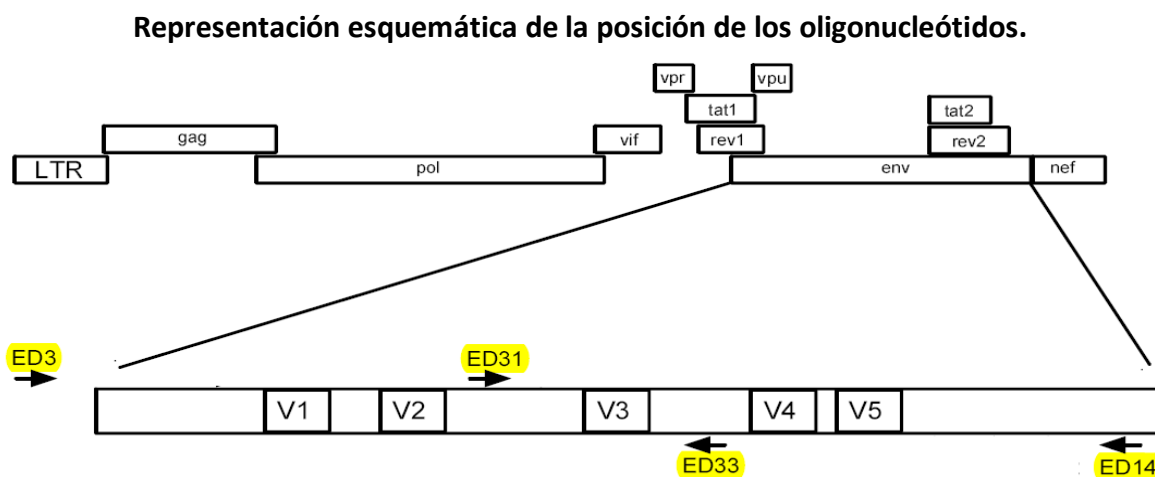


Figura 15. Organización del genoma del VIH, ilustrando la posición de las regiones codificantes. El gen *env* es magnificado para mostrar la posición relativa de las regiones variables (V1 a V5) y la posición de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Tomado de: Protocolo de subtipificación según *env* del VIH-1, versión 5. (Laboratorio de James I. Mullins, Departamento de microbiología Universidad de Washington School of Medicine. Seattle, WA, 98195-8070).

3.8 Electroforesis:

La electroforesis para la observación de los productos de la segunda PCR se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% durante una hora a 120 Voltios, tincionado con bromuro de etidio a una concentración final de 0.05 µg/mL. Todos los controles positivos eran incluidos junto con un marcador de peso molecular HyperLadder® IV (Bioline). Luego de la migración los productos fueron fotografiados en un fotodocumentador (Biorad®) (Ver figura 19).

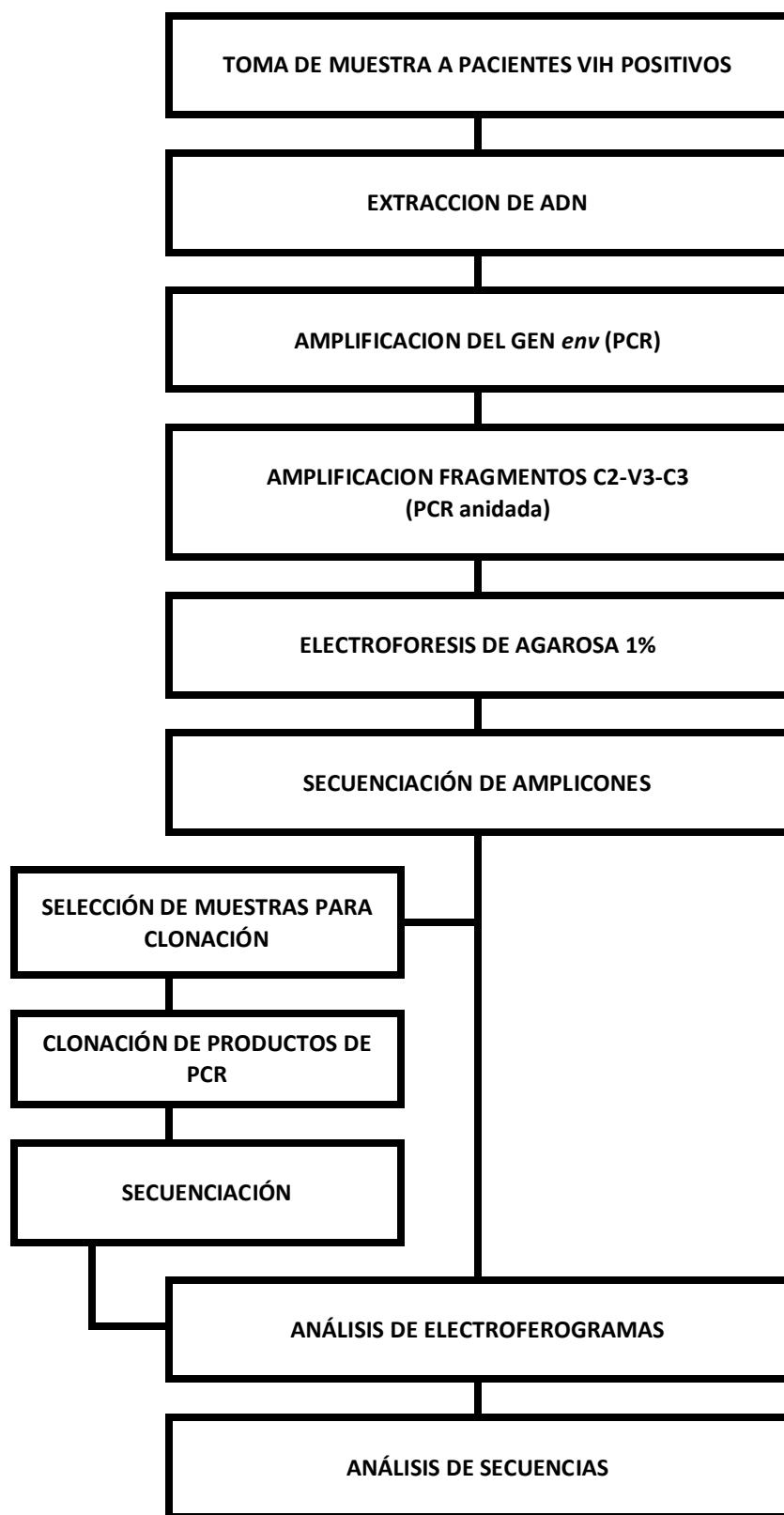
3.9 Secuenciación del ADN:

Muestras de producto amplificado en la segunda ronda fueron sometidas a un proceso de precipitación con EDTA y Etanol, resuspendidas en agua y cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. 90 ng fueron sometidos a una ronda de amplificación para una sola hebra de ADN con el oligonucleótido ED31 (5' **CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG** 3') en una reacción y con el oligonucleótido ED33 (5' **TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C** 3') en otra reacción con el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de amplificación eran analizados en un secuenciador automático marca Applied Biosystems modelo 3130.

3.10 Análisis y alineamiento de las secuencias:

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a revisiones manuales para determinar su calidad y transcritas en aminoácidos usando el programa 4Peaks (Mekentosj B.V. Gerberastraat 117 1431 RA Aalsmeer, The Netherlands. KvK Amsterdam 34282675). Finalmente, todas las 42 secuencias correspondientes al bucle V3, fueron alineadas usando el programa CLC Work Bench (LCLbio).

3.11 Diagrama de Actividades.



4 RESULTADOS.

4.1 Características Epidemiológicas de la Población en Estudio.

Desde el primer reporte en 1983 con unos pocos casos documentados, el VIH se ha convertido en una pandemia que ha llegado a infectar a más de 33.4 millones de personas en el mundo (121). En Latinoamérica se ha estimado que hubo 170.000 nuevos casos en el 2008, aumentando la cifra a 2 millones de personas infectadas, presentando una incidencia del 0.6% caracterizada por una epidemia de bajo nivel. El número de hombres infectados por VIH en América latina es considerablemente más alto que el número de mujeres, este fenómeno se debe en gran parte a la predominancia de la transmisión homosexual entre hombres, representando el porcentaje más alto en Latinoamérica (122). La tendencia de la muestra analizada en nuestro estudio, en donde los hombres representan un 69% de los casos de infección por VIH, podría demostrar que el comportamiento de la epidemia con relación a la distribución por sexos en la costa del Caribe Colombiano es similar a la presentada en Sur América. Igualmente se refleja una concordancia con lo observado en los países de Centro América, en donde existe una probabilidad de cada tres, que los hombres que mantienen relaciones homosexuales, contraigan la infección (123, 124). Otro factor importante observado en la población estudiada, es el inicio de la actividad sexual a edades tempranas. En efecto, el 47.8 % de los individuos, estaba incluido dentro del primer rango de edades, que comprendía edades desde los 16 a los 29 años. En

el segundo rango conformado por individuos de 30 a 39 años se encontraba el 21.7% de la población, porcentaje idéntico a los individuos incluidos dentro del tercer rango y conformado por individuos de 40 a 49 años (125, 126). El bajo nivel de escolaridad es otro factor que incide en la transmisión del VIH. En este estudio se observó una tendencia acorde con este fenómeno pues el 92.2% de la población analizada, presentaba un bajo nivel de formación académica además de bajos ingresos económicos. De los encuestados, el 41 % declaró ser heterosexual, mientras que sólo el 27 % manifestó ser homosexual. Un 12% de la población declaró ser bisexual. (Ver figuras 16 y 17).

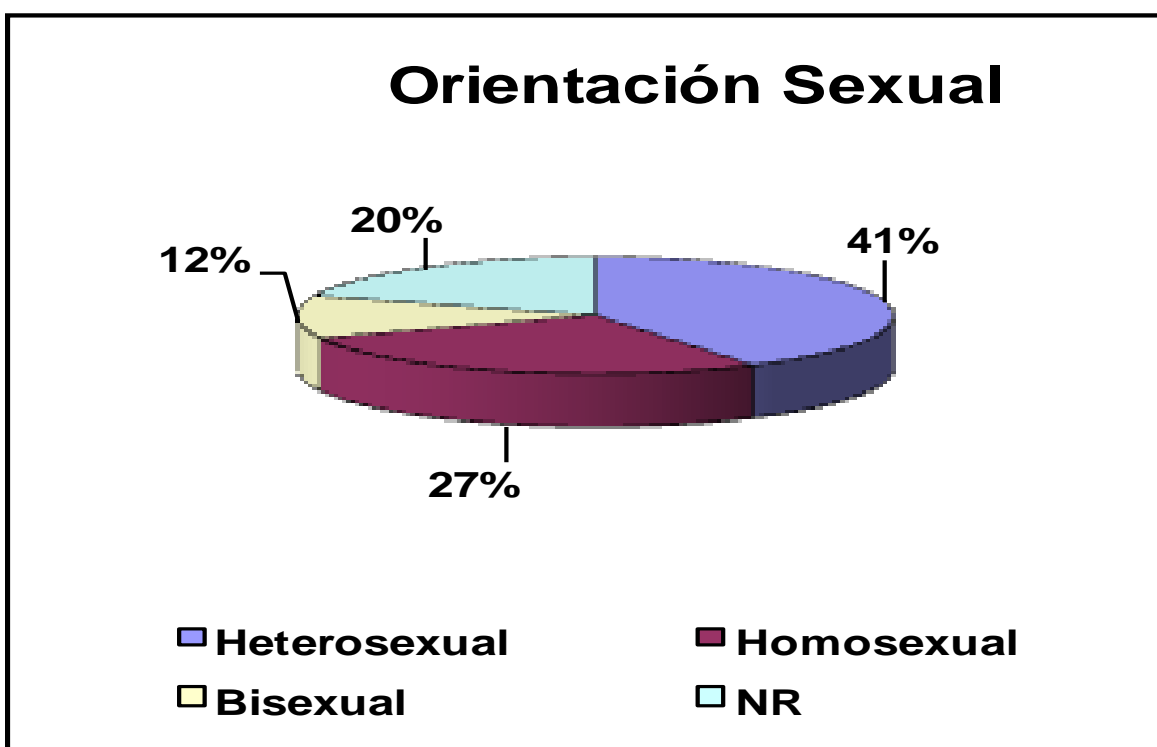


Figura 16. Distribución de la orientación sexual entre la población encuestada.

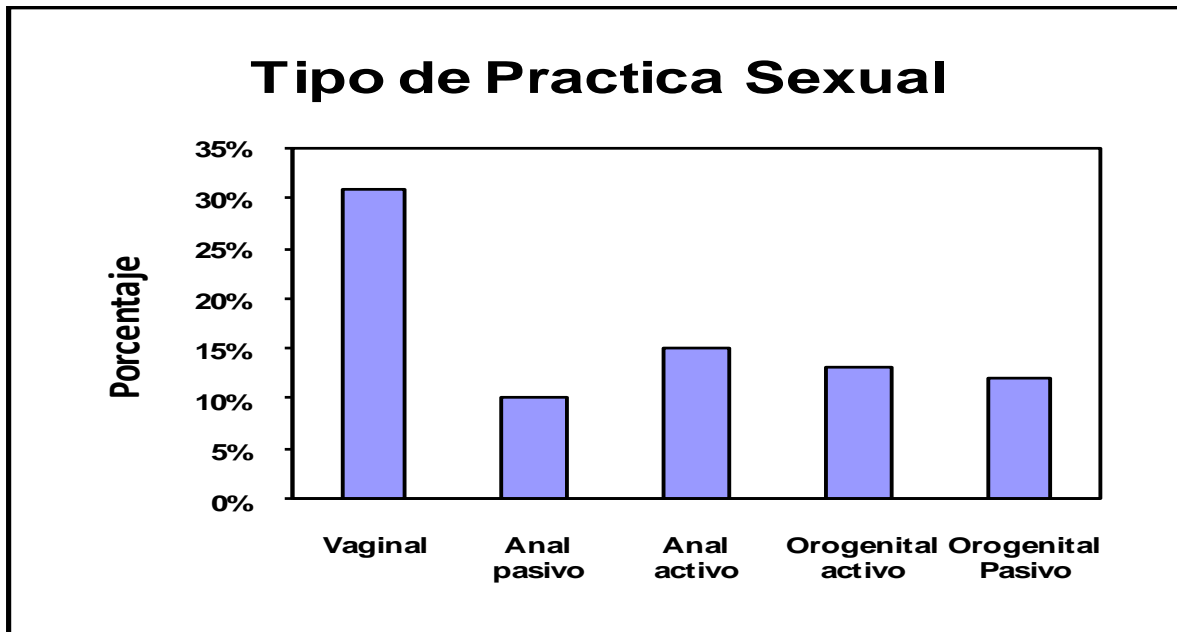


Figura 17. Distribución del tipo de práctica sexual entre la población encuestada.

Estos datos y el hecho de que el 28% de los encuestados, manifestó no tener un compañero sexual estable y no usar preservativo, frente a sólo un 6 % que manifestó tener pareja sexual estable, sugiere que la transmisión del virus está dada principalmente por vía sexual entre la población heterosexual.

Las observaciones realizadas referentes al tiempo de diagnóstico de la infección en el análisis socio demográfico, como se observará más adelante en detalle, están fuertemente ligadas a lo encontrado en el análisis genético de los virus de la población estudiada, pues un periodo corto de Infección está fuertemente relacionado con la presencia de cierto tipo de fenotipo viral no inductor de sincitia (NIS) o M trópico el cual predomina en la etapa asintomática, mientras que un periodo largo de infección esta correlacionado con el cambio de fenotipo viral a T trópico, empleo del correceptor CXCR4 y progresión de la enfermedad a fase

SIDA. El 73% de los individuos estudiados manifestó tener un tiempo de diagnóstico menor a dos años. De otra parte, sólo el 6% de individuos, manifestó tener un tiempo mayor a dos años lo que está relacionado con una baja frecuencia (30.1%) de mutaciones responsables del cambio de fenotipo viral (Ver figura 18 y tabla 1).

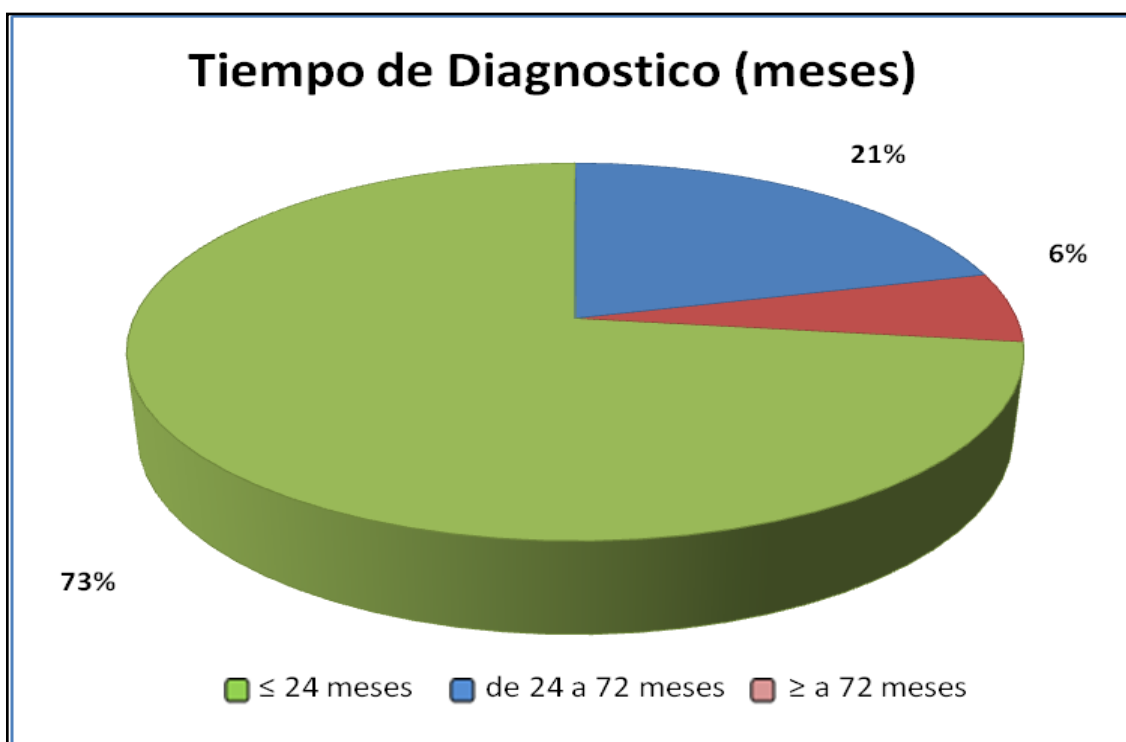


Figura 18. Distribución de individuos según tiempo de diagnóstico en la población encuestada.

4.2 Análisis y Alineamiento de las secuencias de la Región V3.

La región V3 del gen *env* fue amplificada exitosamente por Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Ver figura 15), en 42 muestras (52.5%).

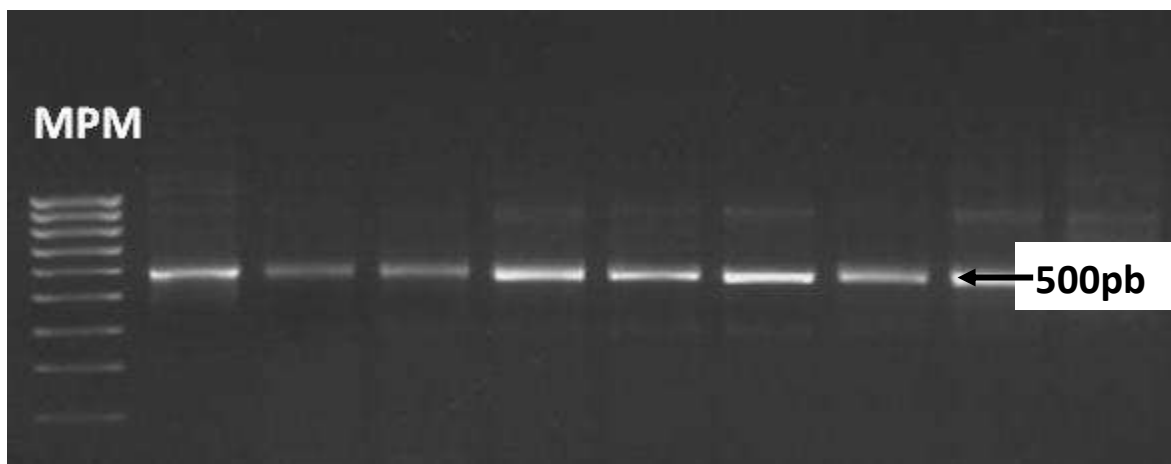


Figura 19. Electroforesis. Gel de agarosa al 1% tincionado con bromuro de etidio. MPM: Marcador de peso molecular HyperLadder® IV (Bioline).

La región V3 es el dominio con mayor tasa de variación, sin embargo esta variación es relativa (127). Pequeños cambios en el tetrámero que está ubicado en la corona del motivo V3 deben disminuir significativamente la combinación de anticuerpos en suero (128). Esto se debe a que el sistema inmunológico tiende a utilizar preferentemente la memoria inmunitaria basada en una versión antigua del virus (129).

El alineamiento múltiple de las secuencias de los aminoácidos deducidos de la secuencia nucleotídica de la región V3 con la herramienta CLC Work bench (CLCbio), muestra que 26 muestras (61.9%) poseen 35 aminoácidos en la región V3 (COL001, COL003, COL004, COL006, COL009, COL011, COL012, COL013, COL014, COL016, COL019, COL021, COL023, COL024, COL026, COL028,

COL029, COL032, COL041, COL042, COL043, COL058, COL059, COL070, COL071, COL075), las restantes 16 muestras (38.1%) poseen 34 aminoácidos (COL005, COL007, COL008, COL015, COL017, COL018, COL020, COL022, COL025, COL033, COL036, COL061, COL062, COL065, COL065, COL074) (Ver figura 20).

4.3 Residuos de cisteína.

Se ha determinado que la cisteína, un aminoácido que contiene Azufre en su estructura y forma enlaces disulfuros dentro de un polipéptido o entre diferentes polipéptidos para aumentar su estabilidad, es responsable de la estructura en bucle característico de la región V3 (Ver figura 13). Se observó la conservación de dichos residuos en todas las secuencias y se determinó que ninguna de las muestras analizadas presenta pérdida de los residuos de cisteína en las posiciones 1 y 35, (correspondiente a las posiciones 296 y 330 de la gp120) (Ver figura 20).

4.4 Corona de la región V3.

La corona de la región V3, situada en las posiciones 15 a 18 (310 a 313 en la gp120), es la tercera porción variable de la gp120. En los virus estudiados, se exhibe una heterogeneidad en la cual predomina el motivo GPGR en 34 muestras (80.1%) propio del subtipo B en Estados Unidos y Europa, seguido del motivo GPGA en 3 muestras (7.1%): COL003, COL020 y COL058. Los motivos GPGQ, GPGK y GPGS se presentan sólo en las muestras COL032, COL025 y COL012, respectivamente. No se encontró el motivo GWG que corresponde al subtipo B encontrado en Brasil (Ver figura 20) (62, 63, 64).

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del bucle V3 de la proteína de envoltura del VIH, comparadas con la secuencia consenso. Los puntos denotan homología entre las distintas secuencias y las diferencias se representan por con una letra según la convención para aminoácidos en una sola letra. En la secuencia consenso, las letras en rojo indican los residuos de Cisteína (C). El sitio de glicosilación está resaltado en azul claro. Las posiciones que ocupan los residuos determinantes del tropismo celular/uso de correceptores (posiciones 11 y 25) están resaltados en verde.

4.5 Sitios de glicosilación.

En la región V3 de la envoltura del VIH sólo se encuentra un sitio de glicosilación representado por el motivo N-X-S/T (N, representa Asparagina; X representa cualquier aminoácido, excepto Prolina; S, representa Serina y T, representa Treonina) ubicado en la posición 6 a 8 (301 a 303 de la gp120) hacia la región N terminal del motivo conservado GPG (ver figura 21).



Figura 21. Secuencia consenso del bucle V3 de la proteína de envoltura del VIH. Se muestra el único sitio de glicosilación y el motivo conservado GPG en la corona del bucle V3.

La importancia de los sitios de glicosilación radica en que se constituyen en el mayor mecanismo para bloquear, evadir o minimizar la respuesta neutralizante de los anticuerpos y promover la persistencia viral (130). Diferentes sitios de glicosilación, especialmente los que se encuentran en la región C3 y C5, ofrecen una sensibilidad variable a la respuesta neutralizante de los anticuerpos, especialmente en el VIH-1 subtipo B (131). Mediante análisis de los potenciales sitios de glicosilación en las muestras estudiadas encontramos que el único sitio (localizado en la posición 6 a 8) estaba presente en todas las 42 muestras analizadas (Ver figura 20).

4.6 Tropismo viral y empleo de correceptor.

La presencia de aminoácidos sin carga o con carga negativa en las posiciones 11 y/o 25 de la secuencia del bucle V3 (306 y 320 en la gp120) se ha asociado al fenotipo viral no inductor de sincitia (NIS) o M trópico el cual predomina en la etapa asintomática, emplea al correceptor CCR5 y posee en la región V3 la secuencia de aminoácidos S/GXXXGPGXXXXXXE/D entre las posiciones 11 y 25 (132).

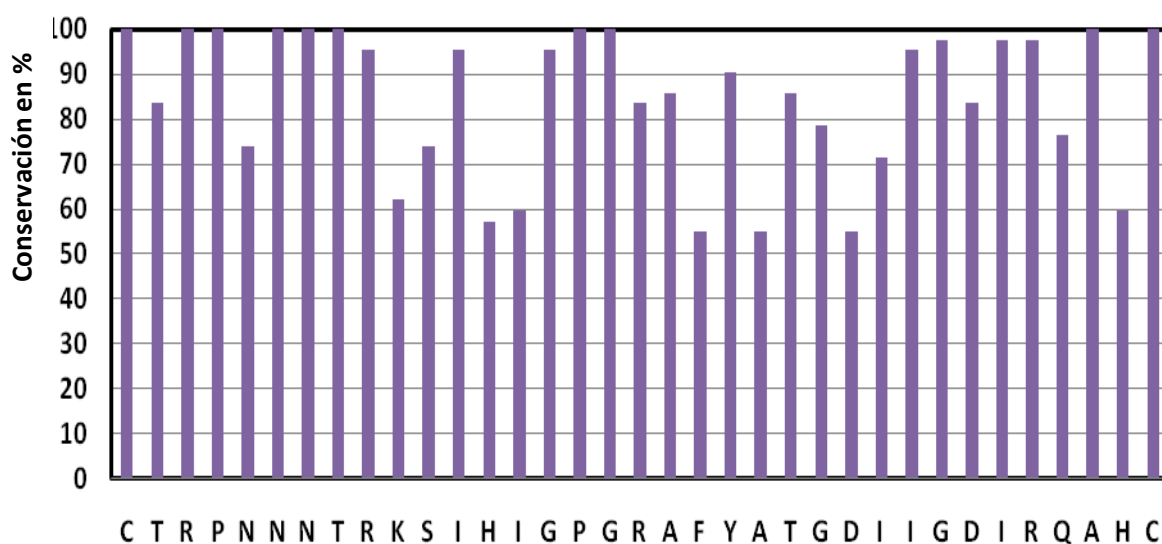


Figura 22. Conservación de los residuos aminoácidos de la secuencia de V3 correspondiente a 42 individuos de la Costa Atlántica Colombiana incluidos en este estudio.

Un cambio a un aminoácido con carga positiva en las posiciones mencionadas, está correlacionado con el cambio de fenotipo viral a T trópico, empleo del correceptor CXCR4 y progresión de la enfermedad a fase SIDA (133). La mayoría de los virus secuenciados en este estudio, presentan aminoácidos sin carga como Serina (S) o con grupos R no polares como Glicina (G) en la posición 11 (306 de la gp120) y aminoácidos con carga negativa como Glutamato (E) o Aspartato (D) en la posición 25 (320 de la gp120). En efecto, 29 muestras (45.23%), poseen la

secuencia S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D entre las posiciones 11 y 25. Los aminoácidos más frecuentes en dichas posiciones son Serina (31 veces) y Acido Aspártico (17 veces), respectivamente. Doce muestras presentaron cambios de aminoácidos en la posición 25 y sólo una presentó cambio de aminoácidos en las posiciones 11 y 25 para un total de 13 muestras (30.1%) con mutaciones (Ver tabla 1 y figura 20).

NUMERO DE PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO	TIEMPO DE DIAGNOSTICO	ESTADO CLINICO	TRANSMISIÓN	SECUENCIA S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D
COL008	49	M	>6 AÑOS	SINTOMATICO	ND	SXXXGPGRXXXXXXXXN
COL009	57	M	ND	ND	ND	GXXXGPGRXXXXXXXXA
COL012	37	M	>4 AÑOS	ASINTOMATICO	HOMOSEXUAL	SXXXGPGSXXXXXXXXN
COL013	48	M	ND	ND	ND	GXXXGPGRXXXXXXXXK
COL020	22	F	>2 AÑOS	ASINTOMATICO	HETEROSEXUAL	GXXXGPGAXXXXXXXXXT
COL024	49	M	>2 AÑOS	SINTOMATICO	HETEROSEXUAL	SXXXGPGRXXXXXXXXQ
COL025	57	M	<1 AÑO	ASINTOMATICO	TRANSFUSIÓN	GXXXGPGKXXXXXXXXA
COL026	32	M	>10 AÑOS	ASINTOMATICO	HOMOSEXUAL	SXXXGPGRXXXXXXXXQ
COL028	38	M	>2 AÑOS	ASINTOMATICO	HOMOSEXUAL	SXXXGPGRXXXXXXXXQ
COL041	54	M	>2 AÑOS	SINTOMATICO	HETEROSEXUAL	SXXXGPGRXXXXXXXXQ
COL064	32	M	<1 AÑO	SINTOMATICO	HOMOSEXUAL	SXXXGPGRXXXXXXXXK
COL071	58	F	<1 AÑO	ASINTOMATICO	ND	DXXXGPGRXXXXXXXXD
COL75	32	F	ND	ASINTOMATICO	ND	R XXXGPGRXXXXXXXXG

Tabla 1. Datos epidemiológicos y clínicos de los 13 individuos con mutaciones en las posiciones 11 y/o 25 del bucle V3 del VIH-1.

Se observó una gran conservación (100%) de los aminoácidos C(posición 1), R(3), P(4), N(6), N(7), T(8), P(16), G(18), A(33) y C(35) a lo largo de las secuencias estudiadas. Sin embargo las posiciones 10 (K), 13 (H), 14(I), 20(F), 22(A), 25(D), 34(H) presentan un porcentaje bajo de conservación que corresponde al 61.91%, 57.14%, 59.52%, 54.76%, 54.76%, 54.76%, 59.52%, respectivamente.

5. DISCUSIÓN.

Un análisis genético del VIH fue desarrollado secuenciando productos de Reacción en Cadena de la Polimerasa del fragmento del gen de la envoltura que comprende desde la región constante C2 hasta la C3. 42 secuencias fueron exitosamente amplificadas a partir de sangre periférica de individuos infectados provenientes de la Costa Atlántica, lo cual nos permitió poseer una muestra representativa para realizar una completa caracterización de este segmento que refleja el comportamiento del virus en esta región del país. Esta tesis forma parte de un macroproyecto en el que el segmento amplificado comprende las regiones C2, V3 y C3 del gen que codifica para la proteína gp120 del VIH. En nuestra disertación nos concentramos en el análisis de la región V3, sujeto de esta tesis de Maestría.

El programa Four Peaks fue utilizado para abrir los cromatogramas correspondientes a las secuencias obtenidas y para “transcribir” las secuencias en aminoácidos. La herramienta CLC Work bench (CLCbio) nos permitió realizar el alineamiento de las 42 secuencias obtenidas en aminoácidos, pudiéndose observar que 26 secuencias (61.9 %) poseían 35 aminoácidos. Las 16 secuencias restantes poseían 34 aminoácidos. Este resultado nos muestra una amplia conservación en lo referente al número de aminoácidos que constituyen esta región lo cual es un determinante importante en la constitución espacial de la proteína de envoltura y en su funcionalidad. Se observó una alta conservación en los residuos de cisteína que enmarcan el bucle V3, estando presentes en el 100%

de las muestras analizadas. En estudios de secuencias realizadas previamente en muestras tanto de Norte América como de Europa y África, también se reportaron una alta conservación de estas cisteínas, inclusive en secuencias correspondientes a subtipos diferentes dentro del grupo M (126, 134, 135). En lo descrito hasta ahora referente al virus circulante en Colombia el comportamiento es el mismo (21). Como es bien sabido, la función de estos aminoácidos, localizados en posición 1 y 35, es la de mantener la estructura en bucle de la región V3 (136). La observación de una alta frecuencia de estos aminoácidos podría entonces confirmar la importancia de la estructura en bucle de esta parte de la proteína gp120 en la funcionalidad y en la estabilidad de la molécula.

La variabilidad de los 35 aminoácidos constituyentes de la región V3 fue determinada con relación a una secuencia consenso. Se observó que sólo 10 residuos (3.5%) eran constantes, lo cual da cuenta de la alta variabilidad de esta región de la proteína. Sin embargo, como lo subrayaremos más adelante, se observó una gran conservación en motivos considerados como clave a lo largo de las secuencias estudiadas. Los residuos más variables encontrados son el Ácido Aspártico (D) localizado en posición 25 dentro del bucle V3, el cual aparece en sólo el 40% de las secuencias y la Histidina (H), en posición 13, presente en el 57%. Una comparación entre nuestra secuencia consenso y la secuencia consenso del subtipo B obtenida de la base de datos de Los Álamos muestra una divergencia en los aminoácidos Alanina (A) en posición 22 y Ácido Aspártico (D) en posición 25 (resultado no mostrado), lo cual no es de sorprender si tenemos en cuenta la gran variabilidad de éstos dos residuos en la base de datos de Los

Álamos. Diferencias similares fueron obtenidas entre secuencias consenso de otros estudios y la secuencia consenso de Los Álamos (127).

El análisis del motivo que constituye la corona del bucle V3 (en las posiciones 15 a 18, es decir 310 a 313 en la gp120) y que ha sido identificado como el principal epítotope de neutralización del VIH-1 mostró que el tetrámero GPGR fue el más predominante, siendo encontrado en 34 muestras (85%). Este motivo ha sido vinculado preferentemente al subtipo B, aislado en Norte América y Europa y caracterizado por poseer el residuo de Arginina (R) en posición 18. Este residuo fue reemplazado por Alanina (A) en tres muestras (020, 058 y 003) y por Glicina (G), Serina (S) y Lisina (K) en las muestras 007, 012 y 025, respectivamente. Éste último tipo de substitución por residuos ácidos en secuencias subtipo B ha sido reportado previamente en otros análisis (137). En una muestra el residuo R se encontró substituido por Glutamina (Q), substitución que normalmente está asociada a muchos subtipos no-B, pero que también podría estar asociada al subtipo B', encontrado últimamente en China en utilizadores de drogas intravenosas como resultado de la deriva del tetrámero GPGR hacia GPGQ en la corona del bucle V3 (41). Podemos entonces especular que esta situación sea la misma en el virus circulante en nuestra región. De otra parte, el primer aminoácido del tetrámero (G) fue reemplazado en dos muestras por A y Q, respectivamente. La substitución del primer aminoácido del tetrámero por Alanina ya había sido reportada en secuencias pertenecientes al subtipo B, ya sea en cepas europeas (127), como en cepas colombianas (21). La substitución por Q, por el contrario, es más bien escasa. En fin, la observación global de la conservación de los

aminoácidos constituyentes de la corona de la región V3 permite concluir que, a pesar de que esta región es el dominio con la más alta tasa de variación, se evidenció una marcada conservación de los aminoácidos constituyentes del tetrámero en las muestras de la región Caribe colombiano y que las variaciones encontradas son bastante limitadas.

En términos de octámeros en la corona del bucle V3, la secuencia HIGPGRAF fue encontrada predominante con un 14.3%. Esta secuencia ha sido asociada con el subtipo B debido a su alta presencia en cepas pertenecientes a este subtipo en la base de datos de Los Álamos, además de que ha sido encontrada en mayor porcentaje que el nuestro en un análisis previo (29%). En este mismo estudio el motivo NIGPGRAF fue encontrado con una frecuencia bastante similar a la nuestra (9.5%) (127). En términos generales, se encontró un amplio rango de secuencias a nivel del octámero en la corona del bucle V3, pudiéndose detectar 26 motivos diferentes en las 42 secuencias analizadas. Esta alta diversidad intrasubtipo observada en el octámero de la corona de la región V3 del virus circulante en el Caribe colombiano debe ser tomada en cuenta en el momento de realizar intervenciones a nivel de los mencionados epítopes.

Se realizó un análisis tendiente a verificar la conservación de los potenciales sitios de glicosilación a nivel de la región V3 en el virus circulante en el Caribe Colombiano. Como se describió anteriormente, estos sitios están determinados por el motivo NXT/S. Se observó que al interior del bucle sólo existe un sitio de glicosilación localizado en los residuos 6 al 8 (posiciones 301 a 303 en la secuencia total de la gp120). Igualmente, observamos una muy alta conservación

de este único sitio, estando presente en todas las 42 muestras analizadas. Una gran conservación de los potenciales sitios de glicosilación a nivel del interior del bucle V3 ha sido la constante en las cepas del subtipo B circulantes en Europa, Norte América y Suramérica (130). Análisis previos del virus en otras regiones de Colombia, muestran la misma tendencia (21). Ha sido bien descrita la importancia de los sitios de glicosilación en la vida media de las proteínas que lo poseen debido a la gran estabilidad que le confieren (138). De otra parte, son determinantes en la interacción de las proteínas con sus receptores. Nuestros hallazgos muestran entonces, por una parte, una gran estabilidad a nivel de la estructura de la proteína de la envoltura del virus circulante y, por otra, una posibilidad de utilizar este motivo como blanco en la elaboración de vacunas.

Se ha determinado que la emergencia de una variante con un fenotipo asociado a la formación de sincitia (SI) se correlaciona con la progresión de la enfermedad y con la patogénesis del SIDA. Esta variante se caracteriza además por infectar preferentemente a linfocitos T debido a que utilizan como correceptor la molécula CXCR4. En los inicios de la infección, por el contrario, predomina el fenotipo no formador de sincitia, (NSI) con un tropismo hacia los macrófagos y utilizador del correceptor CCR5 (132). Como se describió anteriormente el fenotipo NSI está asociado a la presencia de aminoácidos ácidos en la posición 11 y/o 25 de la secuencia del bucle V3, y puede ser fuertemente influenciado por la presencia de sitios de N-glicosilación al interior del bucle (137, 138, 139). De acuerdo a observaciones realizadas en nuestras secuencias se pudo predecir que el 57% de las muestras pertenecen al fenotipo NSI, con tropismo hacia los macrófagos y

utilizadores del correceptor CCR5. Estos resultados son acordes con el estudio clínico realizado a la población ya que estas muestras pertenecen a pacientes con menos de dos años de convivencia con el virus y en estado asintomático. De otra parte, solamente 13 muestras presentaron aminoácidos con carga positiva. Estas muestras correspondieron a pacientes con más de dos años de convivencia con el virus, un conteo bajo de linfocitos T CD4+ ($<200/\mu\text{L}$) y una carga viral elevada. El modo de transmisión del virus entre estos sujetos correspondía a contacto sexual. Dentro de este grupo se detectaron además dos individuos infectados uno por transfusión sanguínea y el otro mediante el compartimiento de jeringas para la inyección de drogas psicoactivas. En ambos casos es factible una infección directa con virus T trópicos SI.

La obtención de la secuencia completa en aminoácidos de la región V3 de la proteína de la envoltura del VIH en 42 muestras de la región del Caribe colombiano nos permitió realizar un análisis total de dicha secuencia. A nuestro entender el nuestro constituye el primer análisis reportado en Colombia de esta región de la envoltura que haya sido realizado con un buen número de muestras. Anteriormente había sido reportado un análisis de secuencias con sólo 12 muestras (21). Sin embargo, basados en la homología de los resultados y en el comportamiento de las cepas estudiadas podríamos hipotetizar que la introducción y la expansión del VIH-1 en Colombia ocurrieron a partir de uno solo o muy pocos eventos. La ventaja de estas observaciones es que en el momento de definir en el país un programa de vacunación se podría utilizar una vacuna diseñada contra los mismos epítopes. Igualess consideraciones se deben tener en cuenta en el

momento de medir las implicaciones de nuestros resultados en la elaboración de estuches de diagnósticos y en el diseño de medicamentos.

En conjunto nuestros resultados, comparados con estudios previos proveen una visión más clara acerca de la situación prevalente de la actual epidemia del VIH-1 en Colombia.

BIBLIOGRAFIA.

1. La Montagne JR. 1989. Immunization programs and human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis. Suppl 3*:S639-43.
2. Schnittman SM, Lane HC, Roth J, Burrows A, Folks TM, Kehrl JH, Koenig S, Berman P, Fauci AS. 1988. Characterization of GP120 binding to CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding. *J Immunol.* 141(12):4181-6.
3. Dewhurst, S., Sakai, K., Bresser, J., Stevenson, M., Evinger-Hodges, MJ and Volsky, DJ. 1987. Persistent Productive Infection of Human Glial Cells by Human Immunodeficiency Virus (HIV) and by Infectious Molecular Clones of HIV. *J Virol.* 61: 3774-3782.
4. Fauci, A. S. 1984. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann. Intern. Med.* 100: 92-106.
5. Navia, B. A., and R. W. Price. 1986. Central and peripheral nervous system complications of AIDS. *Clin. Immunol. Allergy.* 6: 543-558.
6. Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky, and S. Wain-Hobson. 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 2:344-352.
7. Meyerhans, A. F., R. Cheynier, J. Albert, M. Seth, S. Kwok, J. Sninsky, L. Morfeldt-Manson, B. Asjo, and S. Wain-Hobson. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 58:901-910.
8. Saag, M. S., B. H. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, E. S. Parks, W. P. Parks, and G. M. Shaw. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Nature (London)* 334: 440-444.
9. Domingo, E., and J. J. Holland. 1988. High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems, p. 3-36. En: E. Domingo, J. J. Holland, and P. Ahlquist. *RNA genetics.* ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
10. Eigen, M. 1973. Self organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58:65-523.
11. Steinhauer, D. A., and J. J. Holland. 1986. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:409-433.

12. Saksena NK, Wang B, Ge YC, Xiang SH, Dwyer DE, Cunningham AL. 1997. Coinfection and genetic recombination between HIV-1 strains: possible biological implications in Australia and South East Asia. *Ann Acad Med Singapore*. 26(1):121-7.
13. Yirrell DL, Kaleebu P, Morgan D, Watera C, Magambo B, Lyagoba F, Whitworth J. 2002. Inter- and intra-genic intersubtype HIV-1 recombination in rural and semi-urban Uganda. *AIDS*. 25;16(2):279-86.
14. Simon, F., Mauciere, P., Roques, P., *et al.* 1998. Identification of a new Human Immunodeficiency Virus type 1 distinct from group M and O. *Nature Med*. 4: 1032 – 1037.
15. Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, J. W., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F. and Kuiken, C. 1997. A compilation and analysis of Nucleic Acid and Amino Sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.
16. Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 68:1581–1585.
17. Vanden Haesvelde M, Decourt J-L, De Leys RJ, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn H, Saman E. 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African Human Immunodeficiency Virus Isolate. *J Virol* 68:1586–1596.
18. Carr, J. K., Salminen, M., Albert, J., Sanders-Buell, E., Gotte, D., Birx, D., and McCutchan, F. 1998. Full Genome Sequence of Human Immunodeficiency Virus type I Subtypes G and A/G intersubtype Recombinants. *Virology*. 247: 22 – 31.
19. Vidal, N., Mulanga, C., Bazepeo, S. E., Lepira, F., Delaporte, E. and Peeters, M. 2006. Identification and molecular characterization of subtype A4 in central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 22: 182 – 187.
20. Gloria I. Sanchez, Christian T. Bautista, Lindsay Eyzaguirre, Gladys Carrion, Sonia Arias, Warren B. Saterren, Monica Negrete, Silvia M. Montano, Jose L. Sanchez, and Jean K. Carr. 2006. Molecular Epidemiology Of Human Immunodeficiency Virus–Infected Individuals In Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(4): 674-677.
21. Navas, M.C., Letourneur, F., Gomas, E., Boshell, J., Saragosti, S. 1999. Analysis of the V3 Loop Sequences From 12 HIV Type 1 – Infected Patients From Colombia, South America. *AIDS. Res. And Human Retrovirus*. 15: 141 – 144.

22. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1997.
23. Apetrei, C., D. L. Robertson, and P. A. Marx. 2004. The history of SIVs and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Frontiers Biosci.* 9:225–254.
24. Kawai, S., and H. Hanafusa. 1972. Genetic recombination with avian tumor virus. *Virology* 49:37-44.
25. Wong, P. K. Y., and J. A. McCarter. 1973. Genetic studies of temperature-sensitive mutants of Moloney-murine leukemia virus. *Virology* 53:319-326.
26. Clavel, F., M. D. Hoggan, R. L. Wiley, K. Strebel, M. A. Martin, and R. Repaske. 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 63:1455-1459.
27. Hu, W.-S., and H. M. Temin. 1990. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1556-1560.
28. Dang, Q., J. Chen, D. Unutmaz, J. M. Coffin, V. K. Pathak, D. Powell, V. N. KewalRamani, F. Maldarelli, and W. S. Hu. 2004. Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:632–637.
29. Diaz, R. S., E. C. Sabino, A. Mayer, J. W. Mosley, and M. P. Busch. 1995. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. *Transfusion Safety Study Group. J. Virol.* 69:3273–3281.
30. Gao, F., D. L. Robertson, S. G. Morrison, H. Hui, S. Craig, J. Decker, P. N. Fultz, M. Girard, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and P. M. Sharp. 1996. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J. Virol.* 70: 7013–7029.
31. Liu, S. L., J. E. Mittler, D. C. Nickle, T. M. Mulvania, D. Shriner, A. G. Rodrigo, B. Kosloff, X. He, L. Corey, and J. I. Mullins. 2002. Selection for human immunodeficiency virus type 1 recombinants in a patient with rapid progression to AIDS. *J. Virol.* 76:10674–10684.
32. Zhu, T., N. Wang, A. Carr, S. Wolinsky, and D. D. Ho. 1995. Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter. *J. Virol.* 69:1324–1327.

33. Fisher, A. G., B. Ensoli, D. Looney, A. Rose, R. C. Gallo, M. S. Saag, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and F. Wong-Staal. 1988. Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature (London)* 334:444- 447.
34. Sakai, K., S. Dewhurst, X. Ma, and D. J. Voisky. 1988. Differences in cytopathogenicity and host cell range among infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 simultaneously isolated from an individual. *J. Virol.* 62:4078-4085.
35. Robertson, D., Anderson, J., Bradac, J. and cols. 2000. HIV – 1 nomenclature proposal. *Science.* 288: 55 -56.
36. Montavon, C., Toure-Kane, C., Liegeois, F., Mpoudi, E., Bourgeois, A., Vergne, L., Perret, J.L., Boumah, A., Saman, E., Mboup, S., Delaporte, E., Peeters, M. E. 2000. Most *env* and *gag* Subtype A HIV – 1 Viruses Circulating in East and West Central Africa are Similar to the prototype AG Recombinant Virus IBNG. *J acquire Immune Defic Syndr.* 23(5): 363 – 374.
37. Blanco de Armas, M., Rolo, F., Martinez, N., Caballero, A. and cols. 2001. Aplicación del ensayo de movilidad del heteroduplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. *Biotecnología Aplicada.* 18 (3): 149 – 153.
38. Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Cannas – Ferreira, W., and cols. 2002. Molecular Epidemiology of HIV type I Infection in Portugal: High Prevalence of Non – B Subtypes. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 18 (5): 131 – 325.
39. Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., Von Briesen, H., Maniar, J. K., Mahambre, G., Delwart, E., Mullins, J., and Rubsamen-Waigmann, H. 1994. Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) Mixed Infections in India Reveals a Recent Spread of HIV-1 and HIV-2 from a Single Ancestor for Each of These Viruses. *J.Virol.* 68:2161-2168.
40. De Cock, K. M., G. Adjuorlolo, E. Ekpini, T. Sibailly, J. Kovadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly, and H. D. Gayle. 1993. Epidemiology and transmission of HIV-2. *JAMA* 270:2083-2086.
41. Wang, F., Zhou, H., Ling, H., Zhou, H. Z., Liu . W., Shao, Y., and Zhou, J. 2007. Subtype and Sequence Analysis of HIV-1 Strains in Heilongjiang province. *Chin Med J.* 120(22): 2006 – 2010.
42. Hirabayashi K, Tajima K, Soda K, Yi Z, Dong ZX, He CH, Lin YG. 1997. Current status of HIV infection in Yunnan Province of China. *Nippon Koshu Eisei Zasshi.* May;44(5):400-10.

43. Han, W. G., Su, L., Wan, Z., Shao, Y. M., Wang, C. J. and Li, H. 1999. Genomic subtypes of HIV-1 In Henan Province. *Cin. J. Infect Dis (chin)*. 17: 253 – 255.
44. Cui, W. G., Xing, H., Wang, Z., Huang, H. L., Li, H., Ma, P. F. *et al*. Study on Subtype and Sequence of the C2-V3 region of *env* gene Among HIV-1 Strains In Henan Province. *China J. AIDS/STD (Chin)*. 10: 403 – 406.
45. McCutchan, F. E., P. A. Hegerich, T. P. Brennan, P. Phanuphak, P. Singharaj, A. Jugsudee, P. W. Berman, A. Gray, A. K. Fowler, and D. S. Burke. 1992. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res. Human Retroviruses* 8:1887-1895.
46. Ou, C. Y., Y. Takebe, B. G. Weniger, C. C. Luo, M. L. Kalish, W. Auwanit, S. Yamazaki, H. D. Gayle, N. L. Young, and G. Schochetman. 1993. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet*. 341:1171–1174.
47. Piyasirisilp, S., F. E. McCutchan, J. K. Carr, E. Sanders-Buell, W. Liu, J. Chen, R. Wagner, H. Wolf, Y. Shao, S. Lai, C. Beyrer, and X. F. Yu. 2000. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J. Virol*. 74:11286–11295.
48. Su, L., M. Graf, Y. Zhang, H. von Briesen, H. Xing, J. Kostler, H. Melzl, H. Wolf, Y. Shao, and R. Wagner. 2000. Characterization of a virtually fulllength human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B₂) recombinant strain in China. *J. Virol*. 74:11367–11376.
49. Graf, M., Y. Shao, Q. Zhao, T. Seidl, J. Kostler, H. Wolf, and R. Wagner. 1998. Cloning and characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B₂-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14:285–288.
50. Weniger, B. G., Y. Takebe, C. Y. Ou, and S. Yamazaki. 1994. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 8(Suppl. 2):S13–S28.
51. Yang, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Xia, X., Ben, K. and Takebe, Y. 2003. Identification and Characterization of a New Class of Human Immunodeficiency Virus type 1 Recombinants Comprised of Two Circulating Recombinant Forms, CRF07_BC and CRF08_BC in china. *Journal of Virology*. 77(1): 685 – 695.
52. Akouamba, B., Viel, J., Charest, H., Merindo, N., Samson, J., Lapointe, N., Brenner, B., Lalonde, R., Harrigan, R., Boucher, M. and Soudeyns, H. 2005.

- HIV-1 Genetic Diversity in Antenatal Cohort, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 11(8): 1230 – 1234.
53. Masciotra, S., Livellara, B., Belloso, W., Clara, L., Tanuri, A., Ramos, A., *et al.* 2000. HIV-1 Subtype Infections In a Heterosexual Populations In Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16: 1007 – 1014.
 54. M. Campodonico, W. Janssens, L. Heyndrickx, K. Fransen, A. Leonaers, F.F. Fay, M. Taborda, G. Van Der Groen, O.H. Fay. Sequence Note: HIV Type 1 Subtypes in Argentina and Genetic Heterogeneity of the V3 Region. *AIDS Research and Human Retroviruses*. January 1, 1996, 12(1): 79-81.
 55. Velarde-Dunois, K. G., Guimarães, M. L., La Fuente, C., Andrade, R., Arévalo, R., Pantoja, S., Mariscal, R., Sandoval, R., Iriarte, F., Chamón, V., Melgar, M. L., Carvajal, R., and Morgado, M. G. 2000. Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals from Bolivia Reveals the Presence of Two Distinct Genetic Subtypes B and F. *Aids Research And Human Retroviruses*. 16(17): 1921–1926.
 56. Quiñones, M., Dopazo, J., Esté, J., Rota, T. and Domingo, E. 1995. Molecular Characterization Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates From Venezuela. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11: 605 – 616.
 57. Rangel HR, Garzaro D, Gutiérrez CR, Vásquez L, Guillen G, Torres JR, Pujol FH. 2009. HIV diversity in Venezuela: predominance of HIV type 1 subtype B and genomic characterization of non-B variants. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25(3):347-350.
 58. Medina RDF, Jansson M, Halapi E, Russi JC, Libonatti O, and Wigzell H. 1996. Genetic analysis of V3 domain sequences obtained from Uruguayan HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12:1491–1493.
 59. Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, Lopez-Galindez C. 2009. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25(3):351-6
 60. Carrión AG, Laguna-Torres VA, Soto-Castellares G, Castillo M, Salazar E, Negron E, Kolevic L, Montano SM, Sánchez JL, Bautista CT, Oberhelman RA, Kochel TJ. 2009. Molecular characterization of the human immunodeficiency virus type 1 among children in Lima, Peru. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Aug;25(8):833-5.
 61. Aguayo N, Laguna-Torres VA, Villafane M, Barboza A, Sosa L, Chauca G, Carrion G, Coenca B, Perez J, Galeano A, Bautista CT, Sanchez JL, Carr JK, Kochel T. 2008. Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with

- men and people living with AIDS in Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(3):225-31.
62. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBWG, Costa CI, Neves I, Jr, Veloso VG, Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V, and HEC AIDS Clinical Research Group. 1998. Molecular Epidemiology of HIV in Brazil: High prevalence of B subtype and identification of an HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro City. *J AIDS Hum Retrovirol.* 18:488–494.
 63. Monteiro JP, Alcantara LC, de Oliveira T, Oliveira AM, Melo MA, Brites C, and Galvão-Castro B: Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil. 2009. High diversity of HIV genotypes. *J Med Virol.* 81(3):391–399.
 64. Morgado MG, Sabino EC, Shaper EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, et al.: V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from North American=European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994.10:569–576.
 65. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, Souza MI, Fernandes LM, Souza LL, Ishak R. 2009. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25(10):961-966.
 66. Ramos, A., Tanuri, A., Rayfield, R., Hu, D., Cabral, M. *et al.* 1999. Dual and Recombinant Infections: An Integral Part Of The HIV-1 Epidemic In Brazil. *Emerg Infect Dis.* 5: 65 - 74.
 67. Garcia, R., Klaskal, W., Castro, J., Zhang, G. and Baum, M. 1997. HIV/AIDS Surveillance in Colombia: Regional differences in Epidemic Trends. *AIDS.* 11: 1297 – 1298.
 68. Leis J, Baltimore D, Bishop JM, et al. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol.* 1988; 62:1808–1809.
 69. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999; 285:1–32.
 70. Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3099–3104.

71. Massiah MA, Starich MR, Paschall C, Summers MF, Christensen AM, Sundquist WI. Threedimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* 1994;244:198–223.
72. Shehu-Xhilaga M, Kraeusslich HG, Pettit S, Swanstrom R, Lee JY, Marshall JA, Crowe SM, Mak J. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J. Virol* 2001b; 75:9156–9164.
73. Cruceanu M, Urbaneja MA, Hixson CV, Johnson DG, Datta SA, Fivash MJ, Stephen AG, Fisher RJ, Gorelick RJ, Casas-Finet JR, Rein A, Rouzina I, Williams MC. 2006. Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* 30;34(2):593-605.
74. Mariusz Jaskolski, Jerry N. Alexandratos, Grzegorz Bujacz and Alexander Wlodawer. 2009. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. *FEBS J.* 276(11): 2926–2946.
75. Coffin JM. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 267:483–489.
76. Hunter, E. 1978. The mechanism for genetic recombination in the avian retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 79: 295-309.
77. Junghans, R. P., L. R. Boone, and A. M. Skalka. 1982. Retroviral DNA H structures: displacement-assimilation model of recombination. *Cell* 30:53-62.
78. Coffin, J. M. 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* 42:1-26.
79. Goodrich, D. W., and P. H. Duesberg. 1990. Retroviral recombination during reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2052-2056.
80. Stuhlmann, H., M. Dieckmann, and P. Berg. 1990. Transduction of cellular neo mRNA by retrovirus-mediated recombination. *J. Virol.* 64:5783-5796.
81. Luo, G., and J. Taylor. 1990. Template switching by reverse transcriptase during DNA synthesis. *J. Virol.* 64:4321-4328.
82. Blair, D. G., W. S. Mason, E. Hunter, and P. K. Vogt. 1976. Temperature-sensitive mutants of avian sarcoma viruses: genetic recombination between multiple or coordinate mutants and avian leukosis viruses. *Virology* 75:48-59
83. Sarafianos, SG., Marchand, B., Das, K., Himmel, D., Parniak, MA., Hughes, SH., Arnold, E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase:

- molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol.* 2009. 23; 385(3): 693–713.
- 84.Vogt VM, Eisenman R. 1973. Identification of a large polypeptide precursor of avian oncornavirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*;70:1734–1738.
 - 85.Vogt VM, Eisenman R, Diggelmann H. 1975. Generation of avian myeloblastosis virus structural proteins by proteolytic cleavage of a precursor polypeptide. *J Mol Biol.* 96:471–493.
 - 86.Edwards TE, Robinson BH, Sigurdsson ST. 2005. Identification of amino acids that promote specific and rigid TAR RNA-tat protein complex formation. *Chem Biol.* 12(3):329-337.
 - 87.Pumfery A, Deng L, Maddukuri A, De La Fuente C, Li H, Wade JD, *et ál.* 2003. Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr HIV Res.*1(3):343-362.
 - 88.D'orso I, Frankel AD. 2009. Tat acetylation modulates assembly of a viral-host RNA-protein transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106 (9):3101-3106.
 - 89.Dabrowska A, Kim N, Aldovini A. 2008. Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 181(12):8460-8477.
 - 90.Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J. 1999. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem.* 11;273(50):33414-22.
 - 91.Van de Bovenkamp M, Nottet HS, Pereira CF. 2002. Interactions of human immunodeficiency virus-1 proteins with neurons: possible role in the development of human immunodeficiency virus-1-associated dementia. *Eur J Clin Invest.* 32(8):619-27.
 - 92.Mangasarian A, Trono D. The multifaceted role of HIV Nef. *Res. Virol* 1997; 148:30-33.
 - 93.Goldsmith MA, Warmerdam MT, Atchison RE, Miller MD, Greene WC. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement function of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol* 1995; 69:4112-4121.
 - 94.Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* 1999; 9:622-631.

95. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med* 1996; 2:338-342.
96. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391:397-401.
97. Stumptner-Cuvelette, Morchoisne PS, Dugast M, Le-Gall S, Raposo G, Schwartz O, Benaroch P. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98:12144-12149.
98. Mariani R, Skowronski J. CD4 downregulation by nef alleles isolated from HIV-1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:5549-5553.
99. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of viral Nef protein. *Curr. Biol* 1999. 9:613-621.
100. Kestler HWI, Ringler DJ, Mori K, et al. Importance of the *nef* gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*. 1991;65:651-662.
101. Gratton S, Yao X-J, Sundararajan S, Cohen ÉA, Sékaly R-P. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4. Overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. *J. Immunol* 1996; 157:3305-3311.
102. Cohen ÉA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. *Nature* 1998; 334:532-534.
103. Cohen ÉA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214:219-235.
104. Nie Z, Bergeron D, Subbramanian RA, Yao XJ, Checroune F, Rougeau N, Cohen ÉA. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol* 1998. 72:4104-4115.
105. Connors RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 1995; 206:935-944.

106. Sabbah EN, Druillennec S, Morellet N, Bouaziz S, Kroemer G, Roques BP. 2006. Interaction between the HIV-1 Protein Vpr and the Adenine Nucleotide Translocator. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67:145-54.
107. Deniaud A, Brenner C, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr. *Mitochondrion* 2004; 4:223-233.
108. Yang JS, Moon HS. Role of HIV Vpr as a Regulator of Apoptosis and an Effector on Bystander Cells. *Mol Cells* 2006 ; 21: 7-20.
109. Fan L, Peden K. 1992. Cell free transmission of vif-mutants of HIV-1. *Virology* 1992;190:19-29.
110. Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K, Gabuzda D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994; 201:349-355.
111. Sova P, Volsky DJ. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and non permissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *Virol.*1993; 67:6322-6326.
112. Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A. 1988. Active Human Immunodeficiency Virus Protease is required for Viral Infectivity. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 85: 4686 – 4690.
113. Matthews, T.J., Bolognesi D.P. 1988. AIDS Vaccines. *Sci Am.* 259(4):120-7.
114. Starcich, B.R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., McNeely, P.D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E.S., Parks, W.P., Josephs, S.F., Gallo, R.C. et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell.* 45(5):637-48.
115. Cosson P. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J* 1996; 15:5783–5788.
116. Stephane B., Romas G. and Mark A. W. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological reviews*, 59(1). 163–93.
117. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 89(2):263-73.
118. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of viral Nef protein. *Curr. Biol*; 9:613-621.
119. Bhanja, P., Sengupta, S., Yaima, N., Sarkar, K., Kumar, S., Chakrabarti, S. Determination of Gag and Env subtypes of HIV-1 detected

- among injecting drug users (IDUs) in Manipur, India: Evidence for intersubtype recombination. 2005. *Virus research*. 114: 14—153.
120. Van Beveren, C.P., Coffin, J. and Hughes, S. in Weiss, R.L., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. (Eds.); *RNA TUMOR VIRUSES, SECOND EDITION*, 2, Vol. 2: 1102-1123; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1985.
 121. Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868 – 871.
 122. Organización Mundial de la Salud, Programa conjunto de las Naciones Unidas Sobre VIH/SIDA y la Organización Mundial para la Salud OMS, ONUSIDA (2009). Situación de la epidemia de sida, diciembre de 2009. Ginebra.
 123. Baral, S., Sifakis, F., Cleghorn, F., Beyrer, C. 2007. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low- and middle-income countries 2000–2006: a systematic review. *PLoS Medicine*, 4(12):e339.
 124. Soto, R., Ghee, A., Nuñez, C., Mayorga, R., Tapia, K., Astete, S. et al. 2007. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections/HIV and risk behaviors in vulnerable populations in 5 Central American countries. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 46(1):101-111.
 125. Barrientos, J.E. et al. 2007. HIV prevalence, AIDS knowledge, and condom use among female sex workers in Santiago, Chile. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(8):1777–1784.
 126. Bozon M, Gayet C, Barrientos J. 2009. A life course approach to patterns and trends in modern Latin American sexual behavior. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 51:S4–S12.
 127. Casado, C., Urtasun, I., Martin-Walther, M., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J. and López-Galíndez, C. 2000. Genetic analysis of HIV – 1 Samples From Spain. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 23: 68 – 74.
 128. Kalih, M., Baldwin, A., Raktham, S., Wasi, C., Lou, C., Schochetman, G. et al. 1995. The Evolving Molecular Epidemiology of HIV – 1 envelope subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand: Implications for HIV vaccine trials. *AIDS*. 9: 851 -857.

129. Francis, T. 1960. On the doctrine of Original Antigenic Sin. *Proceedings of the American philosophical Society*. 4(6): 572.
130. Leonard, C., Spellman, M., Riddle, L., Harris, R., Thomas, J. and Gregory, T. 1990. Assignment of Intrachain Disulfide Bonds and Characterization of Potential Glycosylation Sites of the Type I Recombinant Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein (gp120) Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Bio Chem*. 265: 10373 – 10382.
131. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, *et al*. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003, 422:307-312.
132. Xiao, L., Owen, S., Goldman, I. *et al*. 1998. CCR5 correceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV – 1 is independent of phylogenetically distinct global isolates: Delineation of consensus motifs in the V3 domain that predicts CCR5 – usage. *Virology*. 240: 83 -92.
133. Tersmette, M., de Goede, REY, Al, BJM, *at al*. 1988. Differential Syncytium – inducing capacity of Human Immunodeficiency Virus Isolates: Frequent Detection of Syncytium – inducing Isolates in Patients with Acquires Immunodeficiency Syndrom (AIDS) and AIDS – related Complex. *J Virol*. 62: 2026 – 2032.
134. Lynch, R, M., Shen, T., Gnanakaran, S. Derdeyn, C. A. 2009. Appreciating HIV Type 1 Diversity: Subtype Differences in Env. *Aids Research And Human Retroviruses*. Volume 25, Number 3, 237 – 248.
135. Zhong P, Burda S, Urbanski M, Kenfack H, Tongo M, Heyndrickx L, Nanfack A, Shang J, Agyingi L, Zolla-Pazner S, Zekeng L, Nyambi P. 2002. HIV type 1 group M clades infecting subjects from rural villages in equatorial rain forests of Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 15;31(5):495-505.
136. Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, *et al*. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:5038–5042.
137. Pádua E, Parreira R, Tendeiro R, Nunes B, Castela J, Soares I, Mouzinho A, Reis E, Paixão MT. 2009. Potential impact of viral load and genetic makeup of HIV type 1 on mother-to-child transmission: characterization of env-C2V3C3 and nef sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25(11):1171-7.

138. Dufau, M., L. 1998. The luteinizing hormone receptor. *Ann. Rev. Physiol.* 60. 461 – 496.
139. Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. 2001. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem.* 20; 276(16):13433-41.

ANEXOS

ANEXO 1. Formato de aceptación.

Formato de aceptación para participar en un proyecto de investigación.

**Yo, _____
IDENTIFICADO CON C.C. NÚMERO _____ DE _____
ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN: “ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) A PARTIR DE VIRUS AISLADOS EN
UNA POBLACIÓN DEL CARIBE” PROPUESTO POR LA UNIVERSIDAD DEL
NORTE.**

**ACEPTO QUE ME SEA TOMADA UNA MUESTRA DE SANGRE PARA LOS
ESTUDIOS MOLECULARES QUE SE REQUIEREN EN ESTE PROYECTO.**

**MI PARTICIPACIÓN ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA Y TENGO
CONOCIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACIÓN Y DEL
MANEJO ETICO Y CORRECTO QUE EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN
VIROLOGIA Y PATOLOGIAS ASOCIADAS DARA A LAS MUESTRAS DE
SANGRE.**

**ACEPTO QUE HE TENIDO CORRECTAMENTE TODAS LAS EXPLICACIONES
DADAS AL RESPECTO POR LOS INVESTIGADORES.**

**NOMBRE: _____
C.C : _____
FECHA: _____**

ANEXO 2. CUESTIONARIO

CUESTIONARIO PARA PROYECTO GENOTIPIFICACION DEL VIH A PARTIR DE VIRUS AISLADOS DE PACIENTES EN UNA REGION DEL CARIBE.

JUNIO 2009 A DICIEMBRE 2009.

1. Código: _____

2. Edad: _____

3. Sexo: F___ M___

4. Hace cuanto tiempo le diagnosticaron el VIH _____

5. Ocupación:

a) Enfermería ___

b) Auxiliar de enfermería___

c) Técnico Laboratorista ___

d) otros _____

6. Estado civil:

Soltero(a) ___

Casado(a) ___

Unión Libre ___

Viudo ___

Divorciado(a) ___

Separado(a) ___

7. Nivel Socioeconómico:

Ingresos familiares.

a) Bajo: Menor o igual a un salario mínimo.

b) Medio: Entre uno y dos salarios mínimos.

c) Alto: más de dos salarios mínimos.

8. Nivel Educativo

Ninguno ___

Primaria ___

Primaria completa ___

Bachillerato___

Bachillerato completo ___

Técnico ___

Profesional ___

Otro _____

9. Práctica sexual:

a) Heterosexual

b) Homosexual

c) Bisexual

10. Formas de práctica sexual.

- () Vaginal
- () Anal Activo
- () Anal Pasivo
- () Oral-Genital activo
- () Oral-Genital Pasivo
- () Otro. Especifique_____

Comportamiento sexual de la persona infectada:

11) ¿Tiene usted un compañero sexual estable? Si ___ NO ___

12) ¿Le es fiel a su compañero estable? Si ___ NO ___

Comportamiento sexual de su compañero.

13) ¿Considera Usted que su compañero le es fiel? Si ___ NO ___

14. Antecedentes Patológicos:

a) ¿Ha sido transfundido? Si ___ NO ___

Si es la respuesta es si ¿Cuándo fue la última vez que fue transfundido?_____

15. ¿Consumo de sustancias psicoactivas?

a) ¿Consume usted sustancias psicoactivas? Si ___ NO ___

b) ¿Se inyecta para consumirlas? Si ___ NO ___

16. Uso compartido de objetos cortopunzantes:

- ¿Ha compartido Jeringas? ____
- ¿Se ha realizado Tatuajes o Piercing? ____
- ¿Ha compartido afeitadoras con otras personas? ____

17. ¿Cuál es la procedencia de la persona que usted cree que lo infecto?

Barranquilla ___ Cartagena ___ Bogotá ___ Otras_____ Extranjero _____

18. ¿Cuál es el mecanismo por medio del cual se contagió con virus de inmunodeficiencia humano (VIH)?

Sexual ____ Uso de jeringas infectadas ____

Madre Hijo(a) ____ Elementos cortopunzantes infectados ____

Desconoce la fuente de contagio ____

19. Exposición Ocupacional

a) ¿Ha presentado accidentes de trabajo en los que considera que la sangre contaminada ha penetrado a través de ojos, nariz o boca?
Si ____ NO ____

b) ¿Ha sufrido accidentes laborales que compromete la piel?
Si ____ NO ____

c) ¿Ha sufrido accidentes de trabajo que comprometan órganos o estructuras internas
Si ____ NO ____

Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, et al. 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*. 458:636–640.

Modrow S, Hahn BE, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, et al. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol*. 1987;61:570–578.

Kilzstajn, S. et al. 2007. Improvement in survival among symptomatic AIDS patients by exposure category in Sao Paulo. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45(3):342–347.

Garcia-Calleja, J.M., del Rio, C., Souteyrand, Y. 2009. HIV infection in the Americas: improving strategic information to improve response. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 51:S1–S3.

Elijah, M., Songok, Raphael, W. L., Michael, K. K., Isaiah, O. G., Rukia, K., Frida, O., Kana, K., Yumi, A., Nicaise, N., Fredrick, O., Yoshihide, F., Jiro, I., Hiroshi, I. Identification of *env* CRF-10 among HIV Variants Circulating in Rural Western Kenya. 2003. *Aids Research And Human Retroviruses*. 19:161-165.

Hwang, C. K., E. S. Svarovskaia, and V. K. Pathak. 2001. Dynamic copy choice: steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase- dependent RNase H activity determines frequency of in vivo template switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12209–12214.

Negroni, M., and H. Buc. 1999. Recombination during reverse transcription:an evaluation of the role of the nucleocapsid protein. *J. Mol. Biol.* 286: 15–31.

Balakrishnan, M., B. P. Roques, P. J. Fay, and R. A. Bambara. 2003. Template dimerization promotes an acceptor invasion-induced transfer mechanism during human immunodeficiency virus type 1 minus-strand synthesis. *J. Virol.* 77:4710–4721.

DeStefano, J. J. 1994. Kinetic analysis of the catalysis of strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* 243:558–567.

DeStefano, J. J., B. Roberts, and D. Shriner. 1997. The mechanism of retroviral recombination: the role of sequences proximal to the point of strand transfer. *Arch. Virol.* 142:1797–1812.